



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DA AÇÃO ANTITUMORAL E DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS APÓS O TRATAMENTO COM UMA FRAÇÃO DE *Mimosa caesalpinifolia* Benth

RENATA ROSADO DRUMOND

Teresina – Piauí

Novembro/2015

RENATA ROSADO DRUMOND

ANÁLISE DA AÇÃO ANTITUMORAL E DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS APÓS O TRATAMENTO COM UMA FRAÇÃO DE *Mimosa caesalpinifolia* Benth

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Teresina – Piauí

Novembro/2015

RENATA ROSADO DRUMOND

ANÁLISE DA AÇÃO ANTITUMORAL E DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS APÓS O TRATAMENTO COM UMA FRAÇÃO DE *Mimosa caesalpinifolia* Benth

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira – Orientador/Presidente
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante – Examinadora
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Lidiane da Silva Araújo - Examinadora
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Adriana Maria Viana Nunes Pinheiro - Examinadora
Universidade Federal do Piauí

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

DEDICATÓRIA

Especialmente, a **Deus**, pelo dom da vida e por todas as oportunidades que me proporcionou.

Ao meu amor maior e melhor presente de Deus na minha vida, minha filha, **Eloá**, que foi o impulso para a minha tomada de decisão em querer ingressar no mestrado. Pois, foi pensando nela que tive a força de vontade de crescer intelectualmente, para que os frutos sejam-lhe benéficos.

A minha amada e querida **mãe**, exemplo de perseverança e dedicação inesgotável. Ela que tanto insistiu para que eu e minha irmã fizéssemos o mestrado. Ela que não cansa de, todo dia, nos incentivar, sempre estimulando para que mais um degrau seja alcançado.

Ao meu amado e estimável **pai**, exemplo de ser humano, de humildade e de integridade. Que, mesmo da sua forma moderada, expressa constantemente a vontade de ver o crescimento profissional e intelectual de suas filhas.

Amados, hoje, dedico a vocês essa vitória! Amo infinitamente!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, a **DEUS**, pai onipotente, soberanamente justo e bom, que reservou e permitiu essa etapa da minha vida, abençoando toda a caminhada.

A minha filha e amor da minha vida, **Eloá Rosado Drumond Quaresma**, que bem pequenina e, talvez no momento mais indispensável da presença da mãe, muitas vezes ficou ausente desse acalento.

Aos meus pais, **Roberto Moaci Campos Drumond e Maria do Carmo Vasconcelos Rosado Drumond**, pelo exemplo de honestidade, humildade, fé e perseverança; pelo amor, educação e dedicação às filhas; e pelo incentivo sem limites aos estudos. A eles, principalmente, por terem feito papel de mãe a minha filha quando estive ausente, dando amor, carinho e aconchego de uma forma tão sublime.

Ao meu amado esposo, **Franc Landi da Silva Quaresma**, pelo companheirismo, compreensão da minha ausência e ajuda nas horas de aperreio.

A minha irmã, **Marcela Rosado Drumond Taimo**, por ter sido uma grande incentivadora e pelo auxílio durante todo o período dessa caminhada, principalmente, nos momentos mais angustiantes. A ela, porque também é mestre em Ciências Farmacêuticas. Talvez, se não fosse, eu também não estivesse chegado onde cheguei, porque somos gêmeas univitelinas e idênticas, principalmente, nos pensamentos.

A minha outra princesa, **Elis Rosado Drumond Taimo**, sobrinha e afilhada, à qual amo como filha e me sinto responsável, o que dá mais impulso ao meu crescimento.

A minha tia **Lúcia** e à **Fátima**, que são duas pessoas imprescindíveis para a minha chegada até aqui, pois, me ajudaram como mãe, cuidando e dando carinho e amor para a minha filha quando eu não podia estar com ela.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e confiança nos meus estudos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, um excelente profissional, pelo ensino, confiança, dedicação, disponibilidade e, principalmente, pela paciência nos momentos em que encontrei dificuldade.

Aos integrantes do Laboratório de Cancerologia Experimental (Labcancer), o doutorando **Jurandy da Silva Nascimento** e os estudantes de graduação **Ariane Neco**, **Ian Sousa** e **Amanda Goudinho** pela disponibilidade e ajuda no desenvolvimento dos meus testes.

À **Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó** e sua aluna **Nayana Bruna**, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho, com a disponibilização da amostra pesquisada.

À **Profa. Ms. Débora Cavalcante Braz** e à **Profa. Dra. Adriana Maria Viana Nunes Pinheiro**, pela grande contribuição nos testes histológicos.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo companheirismo.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica (Lapgenic), a **Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante**, o doutorando **Marcus Vinícius** e a mestranda **Ana Maria**, por todo o apoio durante os meus experimentos.

Aos colegas doutorandos **George Laylson** e **Guilherme**, pela disponibilidade nas horas em que precisei de ajuda.

Ao seu **Manoel**, técnico em patologia do CCA/UFPI, pela valiosa ajuda nos testes histológicos.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará: **Prof. Dr. Davi Felipe Farias**, **Profa. Dra. Ana de Fátima Carvalho** e **Profa. Dra. Cláudia Pessoa**, pela contribuição na execução de alguns testes bioquímicos.

À **Universidade Federal do Piauí (UFPI)**, na qual fiz minha graduação, minha habilitação e, mais uma vez, está me proporcionando crescimento intelectual e profissional.

Ajuda-te a ti mesmo, que o céu te ajudará!
Pede e se vos dará; buscai e achareis; batei à porta e se vos abrirá; porquanto, quem pede recebe e quem procura acha e, aquele que bate à porta, abrir-se-á...
... Do ponto de vista terreno, a máxima: *buscai e achareis* é análoga a esta outra: *ajuda-te a ti mesmo, que o céu te ajudará*. É o princípio da lei do trabalho e, por conseguinte, da lei do progresso, porquanto o progresso é filho do trabalho, visto que este põe em ação as forças da inteligência...
... Deus deu à humanidade a mais do que outorgou ao animal, o *desejo incessante do melhor*, e é esse desejo que o impele à pesquisa dos meios de melhorar a sua posição, que o leva às descobertas, às invenções e ao aperfeiçoamento da *Ciência*, porquanto é a *Ciência* que proporciona o que lhe falta.

O Evangelho Segundo o Espiritismo,
Cap. XXV, Itens 1 e 2.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	18
LISTA DE QUADROS.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.1 Câncer.....	27
3.2 Plantas Medicinais.....	30
3.3 <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.....	32
3.4 Atividade Citotóxica e Antitumoral.....	34
3.5 Toxicidade de plantas medicinais.....	36
Referências.....	38
CAPÍTULO I - Biologia e aplicações pré-clínicas do modelo experimental Sarcoma 180.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
1. Introdução.....	48
2. Materiais e Métodos.....	50
3. Resultados e Discussão.....	50
4. Conclusão.....	60
Referências.....	61
CAPÍTULO II - Potencial citotóxico e antitumoral da casca do caule da planta <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.....	66
Resumo.....	67
Abstract.....	68
1. Introdução.....	69
2. Materiais e Métodos.....	70

3. Resultados e Discussão.....	81
4. Conclusão.....	99
Referências.....	99
CAPÍTULO III – Avaliação de parâmetros fisiológicos e toxicológicos de animais tratados com uma fração do caule de <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.....	107
Resumo.....	108
Abstract.....	109
1. Introdução.....	110
2. Materiais e Métodos.....	111
3. Resultados e Discussão.....	117
4. Conclusão.....	136
Referências.....	136
ANEXOS.....	143
ANEXO A: Trabalhos apresentados em eventos.....	144
ANEXO B: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	146
ANEXO C: Artigo publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBMN	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CI₅₀	Concentração Inibitória 50%
CL₅₀	Concentração Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EtOH	Álcool etílico
E.EtOH	Extrato etanólico bruto
EPC	Eritrócito policromático
EPCMN	Eritrócito policromático micronucleado
E.P.M	Erro Padrão da Média
FAL	Fosfatase alcalina
FDCM	Fração diclorometano
fL	Fentolitros
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT-116	Linhagem de células do carcinoma colorretal
HHM	Hipercalcemia humoral da malignidade
HL-60	Linhagem de células da leucemia promielocítica humana
i.p.	Intraperitoneal
LPL	Lipoproteína lipase
MeOH	Metanol

MN	Micronúcleo
MTT	Sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico
NBUD	Brotos nucleares
NPB	Ponte nucleoplásmica
OVCAR-8	Linhagem de células do carcinoma de ovário
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PTHrP	Proteína relacionada com o hormônio paratireóide
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SF-295	Linhagem de células do glioblastoma
S180	Linhagem de células do Sarcoma 180
U	Unidade
U/L	Unidades por litro
U/mL	Unidades por mililitro
VCM	Volume corpuscular médio
5-FU	5 – Fluorouracil

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Distribuição do Bioma Caatinga no território brasileiro..... 24
- Figura 2:** Representação estrutural da dissertação..... 25

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1:** Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária..... 28
- Figura 2:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma..... 29
- Figura 3:** Ilustração da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth..... 34

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Aspecto externo de camundongos portadores de Sarcoma 180 na região intraperitoneal no oitavo dia após a inoculação de células neoplásicas..... 53
- Figura 2:** Aspecto externo de camundongos portadores do Sarcoma 180 na região axilar no oitavo dia após a inoculação de 4×10^6 células/mL. Camundongos sacrificados com tiopental (150 mg/Kg)..... 54
- Figura 3:** Aspecto macroscópico de tumores Sarcoma 180 dissecados após inoculação na axila de camundongos albinos Swiss, seguida de tratamento de 7 dias consecutivos. A representa tumores do grupo controle negativo (dimetilsulfóxido 5%); B representa tumores do grupo controle positivo (5-Fluorouracil, 25 mg/Kg/dia) e C são tumores removidos de animais tratados com uma substância antitumoral de origem natural..... 54

CAPÍTULO II

- Figura 1:** Processo de obtenção da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth..... 72
- Figura 2:** Conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas..... 73

Figura 3: Redução metabólica da resazurina a resorufina por células viáveis.....	75
Figura 4: Ilustração do teste de viabilidade celular (exclusão por azul de tripan) da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta <i>M. Caesalpinifolia</i> em células do Sarcoma 180.....	77
Figura 5: Ilustração do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta <i>M. Caesalpinifolia</i> em células do Sarcoma 180.....	78
Figura 6: Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i> da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta <i>Mimosa caesalpinifolia</i> em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	80
Figura 7: Efeito da fração diclorometano da casca do caule da planta <i>Mimosa caesalpinifolia</i> (FDCM 5, 25 e 50 µg/mL) na viabilidade de células tumorais do Sarcoma 180, determinado por exclusão de azul de tripan, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorubicina (1 µg/mL) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * p < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls.....	85
Figura 8: Anormalidades nucleares observadas em células do Sarcoma 180, após tratamento com a fração diclorometano da casca do caule de <i>M. Caesalpinifolia</i> , pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	89
Figura 9: Efeito da fração diclorometano da casca do caule da planta <i>Mimosa caesalpinifolia</i> (FDCM 5, 25 e 50 µg/mL) nas alterações nucleares de células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorubicina (1 µg/mL) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * p < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls.....	90
Figura 10: Apoptose (A) e necrose (B) observadas em células do Sarcoma 180, após tratamento com a fração diclorometano da casca do caule de <i>M. caesalpinifolia</i> , pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	91

Figura 11: Potencial citotóxico, por indução de apoptose e necrose, da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* (FDCM 5, 25 e 50 µg/mL), nas células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorrubicina (1 µg/mL) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * p < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls..... 93

Figura 12: Atividade antitumoral da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth em camundongos Swiss fêmeas transplantadas com o Sarcoma 180 e tratadas, via intraperitoneal (50 e 100 mg/Kg/dia), durante 7 dias consecutivos. O controle negativo (C) recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n = 8 animais/grupo). * p < 0,05 comparado com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman Keuls..... 95

Figura 13: Análise histológica dos tumores Sarcoma 180 de camundongos *Mus musculus* tratados com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia*, durante 7 dias consecutivos. O controle negativo (A, B, C e D) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (E e F). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, 50 mg/kg/dia (G, H e I) e 100 mg/kg/dia (J, L e M). Coloração por hematoxilina/eosina. Aumento de 400x e 1000x..... 97

CAPÍTULO III

Figura 1: Isolamento de PBMC por meio da tecnologia de Ficoll Paque® Plus..... 113

Figura 2: Ilustração do teste de micronúcleo (MN) realizado em células da medula óssea de camundongos Swiss fêmeas adultas tratadas, por via intraperitoneal, durante 7 dias consecutivos, com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. Caesalpiniiifolia*..... 117

Figura 3: Análise histológica do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (C e D). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (E e F) e 100 mg/kg/dia (G e H). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 126

Figura 4: Análise histológica dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (C e D). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (E e F) e 100 mg/kg/dia (G e H). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 127

Figura 5: Análise histológica do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 129

Figura 6: Análise histológica do coração de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 130

Figura 7: Análise histológica dos pulmões de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de

50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 131

Figura 8: Análise histológica do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x..... 132

Figura 9: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células) observado na medula óssea de camundongos Swiss fêmeas adultas, após tratamento intraperitoneal (50 e 100 mg/kg/dia), durante 7 dias consecutivos, com a fração diclorometano da casca do caule de *M. caesalpinifolia*. O controle negativo (C) recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5 %) e o controle positivo (5-FU) recebeu 5-fluorouracil 25 mg/Kg/dia. * $p < 0,05$ comparado com o controle (DMSO 5 %) e analisado por ANOVA, seguido por Tukey..... 135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1:** Número de artigos disponíveis nas bases de dados por palavras-chave (Sarcoma e Sarcoma 180)..... 51
- Tabela 2:** Relação de alguns estudos da atividade antitumoral *in vivo* usando Sarcoma 180 como modelo experimental..... 58

CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Linhagens celulares tumorais utilizadas na avaliação da citotoxicidade *in vitro* através do ensaio de MTT..... 74
- Tabela 2:** Atividade citotóxica *in vitro* da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*, após 72 h de incubação, quantificada usando os ensaios de MTT (SF-295, OVCAR-8, HL-60 e HCT-116) e Alamar Blue (S180)..... 83

CAPÍTULO III

- Tabela 1:** Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos adultos *Swiss* fêmeas tratadas com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth, durante 7 dias consecutivos, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo..... 120
- Tabela 2:** Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos *Swiss* fêmeas adultas tratadas, via intraperitoneal, com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*, durante 7 dias consecutivos, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo..... 122
- Tabela 3:** Peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss* fêmeas tratadas, via intraperitoneal, com a fração diclorometano da casca do caule de *Mimosa caesalpinifolia* (FDCM 50 e 100 mg/Kg/dia), durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O

quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo..... 124

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1: Aplicações do modelo experimental Sarcoma 180.....	60
---------------------------------------------------------------------	----

RENATA ROSADO DRUMOND. Análise da ação antitumoral e de parâmetros fisiológicos e toxicológicos em modelos experimentais após o tratamento com uma fração de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. Orientador: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí, 2015.

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Por isso, a procura por substâncias químicas, com novas propriedades quimioterápicas e menos efeitos colaterais, tem grande importância médica e vários métodos celulares e sistêmicos de análise farmacológica têm sido utilizados para encontrar compostos naturais a partir de plantas com propriedades antitumorais. O tumor murino Sarcoma 180 (S180) é bastante usado na pesquisa de substâncias naturais e sintéticas com potencial antitumoral. A espécie vegetal *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth é endêmica do Nordeste do Brasil. Sua folhagem é considerada uma valiosa fonte de alimento para ruminantes, pois possui alto valor nutricional. As flores são melíferas e a casca tem sido usada em medicina caseira, com ação antimicrobiana. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antitumoral e a toxicidade da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da espécie vegetal *Mimosa caesalpiniiifolia* em linhagens celulares tumorais e em camundongos transplantados com o S180. A revisão de literatura sobre o tumor Sarcoma 180 demonstrou que a linhagem do tumor murino tem sido muito utilizada como ferramenta farmacológica na busca de moléculas com potencial antitumoral. A FDCM foi avaliada quanto a sua capacidade citotóxica *in vitro*, frente a quatro linhagens de células tumorais mantidas em cultura pelo método do MTT e frente à cultura primária do tumor S180, pelo ensaio Alamar Blue, após 72 h de exposição. A citotoxicidade da FDCM também foi analisada pelos testes azul de tripan e micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) em células do S180 (5, 25 e 50 µg/mL). Para o teste *in vivo*, a FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia, durante 7 dias consecutivos, em camundongos transplantados com o S180. A FDCM apresentou valores de CI_{50} variando entre 4,7 µg/mL (HL-60 – leucemia promielocítica) e 7,1 µg/mL (OVCAR-8 – carcinoma de ovário), de 29 µg/mL em células de S180 e de 9,1 µg/mL em células mononucleares humanas, além de diminuir o número de células viáveis após 72 h de incubação. A FDCM não se mostrou mutagênica contra células do S180, pois não induziu a formação de micronúcleos, porém confirmou sua citotoxicidade pela indução de apoptose, necrose e pontes nucleoplásmicas. As doses de 50 e 100 mg/Kg/dia revelaram percentuais de inibição tumoral de $64,8 \pm 5,3 \%$ e $80,0 \pm 8,4 \%$, respectivamente. A avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou alteração apenas nos níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST) do grupo tratado com FDCM 100 mg/Kg/dia. Este mesmo grupo apresentou aumento no número de neutrófilos e diminuição de linfócitos, e os dois grupos tratados com a FDCM mostraram redução de eosinófilos, porém, as análises histológicas não revelaram alterações em órgãos-chave. No entanto, as doses testadas foram genotóxicas em eritrócitos policromáticos da medula óssea. A FDCM revelou promissora atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, baixa toxicidade sistêmica e genotoxicidade.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Atividade Antitumoral. *Mimosa caesalpiniiifolia*. Toxicidade sistêmica.

RENATA ROSADO DRUMOND. Analysis of antitumor action and physiological and toxicological endpoints in experimental models after treatment with a fraction of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. Advisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Masters dissertation. Program for Postgraduate Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Federal University of Piauí, 2015.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide, second only to cardiovascular disease. Therefore, the search for new chemical entities with new chemotherapeutic properties and fewer side effects, is of great medical importance, and various cellular and systemic pharmacological analysis methods have been used to find natural compounds from plants with antitumor properties. The murine tumor Sarcoma 180 (S180) is widely used in the study of natural and synthetic substances having antitumor potential. The plant species *Mimosa caesalpinifolia* Benth is endemic to Northeast Brazil. The foliage is considered a valuable source of food for ruminants because it has high nutritional value. The flowers are honey and the bark has been used in folk medicine, with antimicrobial action. The aim of this study was to evaluate the antitumor potential and toxicity of dichloromethane fraction (MGDF) of the stem bark of *Mimosa caesalpinifolia* plant species in tumor cell lines and in mice transplanted with S180. A literature review on Sarcoma 180 tumor demonstrated that the murine tumor line has been widely used as a pharmacological tool in the search for molecules with anti-tumor potential. The MGDF was evaluated as to its cytotoxic ability *in vitro* against four tumor cell lines maintained in culture by the MTT opposite the primary culture and the S180 tumor, by Alamar Blue assay after 72 h of exposure. The cytotoxicity of the MGDF was also analyzed by trypan blue test and cytokinesis block micronucleus with (CBMN) in S180 cells (5, 25 and 50 µg/mL). For *in vivo* testing, MGDF was administered intraperitoneally at doses of 50 and 100 mg/kg/day for 7 consecutive days in mice transplanted with S180. The MGDF had IC₅₀ values ranging between 4.7 µg/mL (HL-60 - promyelocytic leukemia) and 7.1 µg/mL (OVCAR-8 - Ovarian carcinoma), 29 µg/mL in S180 cells and 9.1 µg/mL in human mononuclear cells, in addition to reducing the number of viable cells after 72 h incubation. The MGDF was not mutagenic against S180 cells it did not induce the formation of micronuclei, but confirmed its cytotoxicity by inducing apoptosis, necrosis and nucleoplasmic bridges. The doses of 50 and 100 mg/kg/day showed tumor inhibition percentage of 64.8 % ± 5.3 and 80.0 ± 8.4 %, respectively. Evaluation of biochemical parameters showed only changes in the levels of the enzyme aspartate aminotransferase (AST) in the group treated with MGDF 100 mg/kg/day. This same group showed an increase in the number of neutrophils and decrease in lymphocytes, and the two groups treated with MGDF showed reduced eosinophil, however, histological analysis revealed no changes in key organs. However, the tested doses were genotoxic polychromatic erythrocytes in the bone marrow. The MGDF showed promising antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, low systemic toxicity and genotoxicity.

Keywords: Cytotoxicity. Antitumor activity. *Mimosa caesalpinifolia*. Systemic toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem afligido os seres humanos ao longo de sua história. Por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, é uma das doenças que mais causa temor na sociedade (RIOS, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). Assim como no resto do mundo, as neoplasias apresentam altas taxas de mortalidade no Brasil e elevados custos clínicos assistenciais (BOING et al., 2007).

A incidência do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá, ainda mais, em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas (INCA, 2014). Portanto, na luta contra o câncer, procurar novas substâncias químicas com propriedades quimioterápicas é realmente digno, e vários métodos têm sido utilizados para a descoberta de compostos, incluindo o isolamento a partir de plantas e animais e o uso da química sintética e combinatória e modelagem molecular (MILITÃO et al., 2012; SHAH et al., 2013; FERREIRA et al., 2015).

A descoberta de medicamentos à base de plantas resultou principalmente no desenvolvimento de agentes anti-infecciosos e antitumorais e continua a contribuir para a entrada de novos compostos em ensaios clínicos (SILVA, 2015), pois cerca de 60% dos fármacos utilizados atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais, tais com paclitaxel, docetaxel, vimblastina, vincristina, vindesina, camptotecina e irinotecano (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O Brasil, possuidor de grande quantidade de espécies nativas, é também um grande produtor de plantas medicinais, tanto para o consumo da população (consumo interno) quanto para fins de exportação (consumo externo), além da grande relevância para as pesquisas que incentivam a comprovação da eficácia terapêutica e recuperação da saúde (GALLOTE; RIBEIRO, 2005). Análises criteriosas apontaram um cenário com grande heterogeneidade de formações vegetais e alta diversidade de espécies quando se compara o semiárido brasileiro com outros estudos desenvolvidos no mundo (LEAL; SILVA; TABARELLI, 2003).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com 800 a 900 mil km², que ocupa uma boa parte do nosso território (cerca de 11% do território nacional). Engloba regiões de clima semiárido dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do

Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte norte de Minas Gerais (**Figura 1**). O nome do bioma advém do tupi-guarani e significa mata branca, uma referência à cor dos troncos das plantas que perdem sua folhagem nos períodos mais secos. A sua utilização inadequada está levando ao desaparecimento de algumas espécies e à consequente perda da biodiversidade (KIILL et al., 2007), uma vez que ela tem sofrido grande extrativismo dos recursos, com perda de diversidade biológica associada ao fornecimento de madeira e extratos vegetais (SILVA; FREIRE, 2010).

O estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira, pois se encontra entre as regiões naturais menos estudadas. Além disso, é a região menos protegida, uma vez que as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território, assim fica despercebido um extenso processo de alteração e deterioração ambiental acirrado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região. Atualmente, mais de 50% da área de caatinga já foi alterada ou comprometida, e a perda da cobertura vegetal pode ser considerada como a principal prova da diminuição da diversidade (KIILL et al., 2007).

Figura 1 – Distribuição do Bioma Caatinga no território brasileiro.



Fonte: Instituto Sociedade, População e Natureza – ISPN (2015).

Dentre as espécies da Caatinga, encontra-se a *Mimosa caesalpinifolia* Benth, popularmente conhecida como sabiá ou sansão-do-campo, e, no Piauí, como unha-de-gato, que é uma planta pioneira, decídua, heliófita, com ocorrência preferencial em solos profundos, tanto em formações primárias quanto secundárias (LORENZI, 2000). Além de diversas finalidades, é utilizada na medicina tradicional (SILVA et al., 2014). Assim, diante do potencial farmacológico das plantas do semiárido brasileiro (FERREIRA et al., 2011; FARIAS et al., 2013) e como forma de agregar valores aos produtos regionais, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral e a toxicidade da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* ao nível celular e sistêmico em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Dentro deste contexto, essa dissertação intitulada “**Análise da ação antitumoral e de parâmetros fisiológicos e toxicológicos em modelos experimentais após o tratamento com uma fração de *Mimosa caesalpinifolia* Benth**” foi estruturada em capítulos (Figura 2).

O primeiro capítulo trata de uma revisão bibliográfica sobre o modelo experimental Sarcoma 180, o qual foi utilizado nos testes antitumorais. O segundo capítulo aborda o potencial citotóxico *in vitro* e antitumoral *in vivo* da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*. O terceiro capítulo fornece dados fisiológicos e toxicológicos da mesma fração, administrada por via intraperitoneal.

Figura 2 - Representação estrutural da dissertação.



Fonte: Autoria própria (2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial antitumoral e a toxicidade da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* Benth ao nível celular e sistêmico em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a citotoxicidade *in vitro* da FDCM contra células tumorais, usando os ensaios do MTT, Alamar Blue®, azul de tripan e micronúcleo com bloqueio de citocinese.
- ✓ Determinar histologicamente e avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da FDCM em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade da FDCM em células normais mononucleares de sangue periférico humano;
- ✓ Analisar o perfil bioquímico e hematológico de camundongos tratados com a FDCM;
- ✓ Comparar macroscopicamente e observar histologicamente os órgãos dos animais após tratamento com a FDCM;
- ✓ Determinar a genotoxicidade/mutagenicidade da FDCM em células da medula óssea de animais tratados com a FDCM, através do Teste de Micronúcleo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

A palavra câncer tem origem latina (*cancer*) e significa “caranguejo”, cuja terminologia foi aplicada por sua semelhança com o modo de crescimento infiltrante, comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e impedir sua remoção (ALMEIDA et al., 2005). A grande complexidade dos cânceres gera consideráveis desafios para a descrição de sua biologia, e inspira o estudo do câncer no contexto de sistemas moleculares, celulares e fisiológicos (MASOUDI-NEJAD et al., 2015).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2014). A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA et al., 2005). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes e de mortes em todo o mundo (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - *Agency for Research on Cancer*) da OMS estima que houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, no ano de 2012 (INCA, 2014).

Nos últimos 25 anos, estudos epidemiológicos tem confirmado a contribuição de fatores específicos do estilo de vida na etiologia do câncer, tornando o câncer uma doença capaz de ser prevenida em cerca de 50% dos casos (COLDITZ et al., 1996). Os fatores ambientais divergem bastante entre as populações e incluem obesidade, ausência de atividade física, peso ao nascer, idade de início da puberdade, dieta, infecções microbianas, consumo de álcool, uso de tabaco e de medicamentos, exposição ocupacional (água e ar) e causas de base reprodutiva. Todos esses fatores ambientais com potencial carcinogênico podem demorar anos

até transformarem a célula, de forma a originar um tumor clinicamente detectável (DOLL; PETO, 1981; COLDITZ et al., 1996; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES 2003).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2014/2015 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos, incluindo os casos de pele não melanoma (**Figura 1**), reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil pra o sexo masculino e 190 mil para o feminino. Em homens, o tipo mais incidente será o câncer de próstata e nas mulheres, o de mama (INCA, 2014) (**Figura 2**).

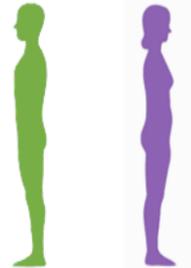
Figura 1 - Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2015).

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2015).

O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração nos sistemas de regulação da proliferação e de diferenciação celulares. A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

As seis características que a grande maioria dos tumores necessita para a progressão maligna são: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, capacidade de evadir a apoptose, potencial replicativo ilimitado, sustentada angiogênese e invasão do tecido adjacente (metástase). Recentemente, a sétima marca, câncer relacionado à inflamação (CRI) foi proposta e refere-se à indução de instabilidade genética por mediadores inflamatórios, levando à acumulação de alterações genéticas. CRI é acompanhada de remodelação do tecido e angiogênese (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010).

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada

aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SOUZA, 2004).

Alguns protocolos em andamento que fazem uso da combinação de diversos agentes antineoplásicos estão conseguindo resultados com índices surpreendentes de cura de até 90%. No entanto, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado. O carcinoma de pulmão, um dos mais frequentes em todo o mundo, apresenta respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis. Como a monoterapia apresenta apenas resposta parcial em 15 a 20% dos casos e com as associações terapêuticas não ultrapassa de 40 a 50%, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas. Por outro lado, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área de oncologia farmacológica, tornando-se importante a informação sobre os aspectos bioquímicos, químicos e biológicos destes quimioterápicos em potencial (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012).

3.2 Plantas medicinais

Os seres humanos sempre fizeram uso de sua flora nativa (TETIK; CIVELEK; CAKILCIOGLU, 2013). As populações humanas convivem com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de explorá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Dentre estas, do repertório cultural, destaca-se o conhecimento sobre a utilização de plantas para fins terapêuticos (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010; FERREIRA et al., 2014).

O conhecimento tradicional de plantas e suas propriedades sempre foram transmitidos de geração em geração através do curso natural da vida cotidiana (AGRA et al., 2008; TETIK; CIVELEK; CAKILCIOGLU, 2013). A medicina tradicional é usada em todas as partes do mundo e tem uma importância econômica de rápido crescimento, principalmente pelo uso de plantas medicinais que têm uma posição respeitável hoje. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a estimativa sugere que muitos países desenvolvidos têm uma grande proporção da população fazendo uso da prática tradicional de saúde, especialmente o uso de plantas

medicinais. Embora o acesso à medicina moderna esteja disponível nestes países, o uso de ervas medicinais manteve a sua popularidade por razões históricas e culturais (AGRA et al., 2008). Por outro lado, nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para as necessidades de cuidados de saúde primários (AGRA et al., 2008; VILAR; FERRI; CHEN-CHEN, 2011; BHAT; KUMAR; BUSSMANN, 2013).

A utilização de espécies vegetais para o tratamento, cura ou prevenção de doenças é uma prática terapêutica bastante antiga, que atualmente tem sido revalorizada (DE BONA et al., 2012). Desde os tempos antigos, produtos naturais, ervas e especiarias são utilizados para a prevenção de diversas doenças, incluindo o câncer (MEHTA et al., 2010). Estudos para conhecimento de plantas medicinais e seus usos, representa um papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas (AGRA et al., 2008).

Recentemente, cerca de 25% da alopátia são derivados de compostos à base de plantas, e muitos outros, são análogos sintéticos construídos em compostos protótipos isolados a partir de espécies de plantas (BHAT; KUMAR; BUSSMANN, 2013).

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, com mais de 40.000 espécies de plantas e cerca de 20% do número total de espécies do planeta (SILVA et al., 2013; SILVA, 2015). Esse imenso patrimônio genético tem, na atualidade, valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A utilização de plantas medicinais reflete a realidade de parte da população brasileira, cujo limitado acesso aos programas de saúde pública levou ao desenvolvimento e conservação de um conhecimento etnofarmacobotânico rico de informações (SANTOS; LIMA; FERREIRA, 2008).

O reconhecimento da importância de plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e terapeuticamente mais eficazes foi finalmente e nacionalmente oficializado pelo lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813 em 22 de junho de 2006, a qual estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos e ao uso sustentável da Biodiversidade Brasileira (BRASIL, 2006).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na terapêutica antineoplásica e quimiopreventiva principalmente baseada em produtos naturais provenientes de plantas e micro-organismos (NEWMAN; CRAGG, 2012). A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural. Porém, a grande heterogeneidade das células tumorais dificulta o tratamento e facilita a manifestação de resistência, fatores que estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Nesse contexto, plantas medicinais com atividade antitumoral têm chamado atenção de institutos farmacêuticos à medida que cientistas percebem que elas são uma fonte quase infinita para o desenvolvimento de drogas e que, na maioria das vezes, apresentam baixa toxicidade, apresentando pouco ou nenhum efeito colateral (WANG; LIN; YE, 2006). Enquanto drogas sintéticas contra o câncer causam uma morte não específica das células, alguns produtos de origem vegetal oferecem ações protetoras e terapêuticas, com baixa citotoxicidade e benefícios para pessoas imunocomprometidas (GÁLVEZ et al., 2003; SILVA, 2015).

3.3 *Mimosa caesalpinifolia* Benth

Mimosa caesalpinifolia Benth, popularmente conhecida como sabiá, sansão-do-campo ou cascudo, é uma planta pioneira, arbórea, decídua, heliófita, com ocorrência preferencial em solos profundos, tanto em formações primárias quanto secundárias (LORENZI, 2000; SANTOS et al., 2015). Nativa da região Nordeste do Brasil, mais precisamente, da Caatinga e do Cerrado. Pertence à família Mimosaceae, estando presente desde o Maranhão até o norte de Minas Gerais. Em terras piauienses, é chamada popularmente de unha-de-gato (FARIAS; CASTRO, 2004; SANTOS et al., 2015). O Ceará é considerado o maior produtor e exportador de estacas de sabiá no Nordeste, concentrando a maior parte de sua produção na região norte do estado (LEAL JÚNIOR; SILVA; CAMPELLO, 1999).

É uma planta que se propaga totalmente por via sexuada, no entanto, há grande heterogeneidade no formato, coloração e tamanho das sementes, que se encontram nos frutos (pequenas vagens) (ALVES et al., 2005). A árvore apresenta características ornamentais, o tronco chega a 30 cm de diâmetro e sua madeira é de ótima qualidade, apropriada para usos externos, como mourões, estacas, postes, lenha e para carvão. O tronco apresenta espinhos que se perdem quando a casca

engrossa. A casca apresenta coloração castanho claro e, à medida que envelhece, altera para cinza acastanhado (CARVALHO, 2007; RIBASKI et al., 2003). As flores são brancas, levemente perfumadas e dispostas em inflorescências formadas em espigas cilíndricas, parecendo com pedaços de algodão e surgem na primavera e verão. As folhas são bipinadas e alternas e possuem de 3 a 8 cm de comprimento e, durante o inverno ou estiagem, as mesmas são perdidas. As folhas frescas ou fenadas são utilizadas como fonte de alimento para o gado e para os caprinos, especialmente durante a época seca e de escassez de chuvas no semiárido, e também, como cerca viva. Por ser pioneira, é ideal para recomposição de áreas degradadas (LORENZI, 2000; ALVES et al., 2005). Imagens da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* podem ser observadas na **Figura 3**.

Por ser uma espécie nativa da região semiárida, a *Mimosa caesalpiniiifolia* constitui-se numa das leguminosas arbóreas com grande potencial, devido a sua resistência a estiagens prolongadas, crescimento rápido e alto teor protéico e mineral das folhas e bom potencial forrageiro (ALMEIDA; VASCONCELOS; NESS, 1986; MONÇÃO et al., 2014).

Considerando a análise do pólen de mel, própolis e pólen de abelhas *Apis mellifera* e nativas sem ferrão da região Nordeste do Brasil, a planta sabiá contribui significativamente para a produção de mel e pólen na região (MONÇÃO, 2014). O uso medicinal da espécie é a cerca da utilização da casca da planta para estancar hemorragias e lavagem de ferida, a fim de prevenir a inflamação. Além disso, a ingestão da infusão da casca é utilizada no tratamento de bronquite, e o vapor de flores é utilizado pela população do semiárido para o tratamento de hipertensão (SANTOS et al., 2015).

O extrato da casca possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (CALLOU et al., 2012), o que explica seu uso popular como tônico no tratamento da bronquite, para estancar sangramentos e cicatrização de ferimentos (CARVALHO, 2007).

Figura 3 – Ilustração da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth.



Fonte: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas da Associação de Plantas do Nordeste (2015).

Segundo Silva et al. (2011), muitas espécies de plantas encontradas na Caatinga têm sido amplamente utilizadas na medicina popular e para a produção comercial de produtos fitoterápicos. No entanto, essas plantas medicinais da flora nativa são, comumente, consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Esse consumo com finalidade curativa é mais difundido em áreas rurais, onde o acesso ao atendimento clínico-laboratorial é difícil e financeiramente mais dispendioso (HOLETZ et al., 2002), sendo as plantas, na maioria das vezes, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (PINILLOS et al., 2003; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005), fato que favorece a manifestação de efeitos tóxicos.

3.4 Atividade citotóxica e antitumoral

Com o aprimoramento da cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos, possibilitando o desenvolvimento de metodologias para triagem *in vitro* (NCI, 2015).

A maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular (ALMEIDA et al., 2005). Na avaliação da atividade antiproliferativa, os testes de citotoxicidade *in vitro* com células

neoplásicas são os mais amplamente utilizados (SKEHAN et al., 1990; SUGGITT; BIBBY, 2005; HOLBECK, 2004; SILVA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015). Assim, os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para a avaliação de agentes antitumorais, sendo que, pelo menos durante a fase de *screening*, têm reduzido os ensaios *in vivo* em animais. Além disso, são muito utilizados como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (CINGI; DE ANGELIS; FORTUNATI, 1991; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos em linhagens celulares tumorais é verificada por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo (KEAWPRADUB et al., 1999; BOGO, 2012). A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON et al., 2007). O teste ideal para a proliferação celular *in vitro* e citotoxicidade é uma medida simples, rápida, eficiente, confiável, sensível, segura e rentável de viabilidade celular. Obviamente, não deve interferir com o composto a ser testado (O'BRIEN et al., 2000).

Desta forma, o ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral (HOUGHTON et al., 2007).

A atividade citotóxica seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir, necessariamente, resultados *in vivo*, pois, em estudos *in vivo*, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são consideradas, ao contrário do que acontece com a maioria dos ensaios *in vitro*. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é indicado para uma avaliação mais completa a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (SMITH et al., 2005). Assim, o modelo *in vivo* tem a importância de confirmar a atividade antitumoral observada em cultura de células, superando as limitações dos modelos *in vitro*. Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral *in vivo* é tumor Sarcoma 180, que é um sarcoma de camundongos, descoberto em 1914 (MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; BOGO, 2012; MILITÃO et al., 2012; FERREIRA et al., 2015).

No último século, o desenvolvimento de agentes citotóxicos revolucionou a terapia anticâncer, pois o tratamento adjuvante com esses agentes tem demonstrado uma vantagem incontestável quando comparado ao tratamento

tradicionalmente baseado na cirurgia e monoquimioterapia, tornando possível a cura de neoplasias como leucemia aguda infantil, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumores de células germinativas (SOUZA et al., 2007; ISMAEL et al., 2008).

As plantas têm oferecido uma oportunidade para a descoberta de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais contra diferentes tipos histológicos de câncer, estando, inclusive, vários destes compostos, além de outros já aprovados para o tratamento, em estudos de fase clínica para a avaliação e compreensão de sua eficácia terapêutica, do seu mecanismo de ação e dos efeitos adversos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005).

3.5 Toxicidade de Plantas Medicinais

Estudos de toxicidade são extremamente importantes, pois ainda existe a crença de que as plantas medicinais, por serem utilizadas a milhares de anos, apresentam eficácia comprovada e ausência de efeitos colaterais e riscos à saúde (DE BONA et al., 2012). Entretanto, sabe-se que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Esse consumo, com finalidade curativa, é mais difundido em áreas rurais, onde o acesso ao atendimento clínico-laboratorial é difícil e financeiramente mais dispendioso (HOLETZ et al., 2002), sendo as plantas, na maioria das vezes, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005). Esse fato é que favorece a manifestação de efeitos tóxicos, principalmente, devido a mecanismos químicos de proteção, além dos mecânicos (como espinhos, cornos e pêlos ou o desenvolvimento de revestimento) (CHEEKE, 1998). Geralmente, os mecanismos químicos de defesa são representados por substâncias tóxicas que se concentram nas partes da planta que mais contribuem para o desenvolvimento, como folhas novas, ramos de florescência e sementes (RALPHS; GARDNER; PFISTER, 2000). As principais classes de constituintes químicos de plantas com atividade farmacológica que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são os ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides,

cumarinas e flavonóides (MATOS, 1988), sendo os alcalóides, glicosídeos, lecitinas e ácidos orgânicos as classes químicas mais importantes na toxicologia de vegetais (CHEEKE, 1998).

Para um reconhecimento preciso da toxicidade de plantas deve-se ter familiaridade com as plantas da região e o conhecimento das variações sazonais na concentração de substâncias tóxicas. Cada planta, assim como outras causas de doenças, produz quadros clínico-patológicos mais ou menos característicos e os achados podem comprovar a etiologia e auxiliar no diagnóstico diferencial. A cultura e o desconhecimento da população, além da quantidade ingerida pelo acidentado são fatores que dificultam o diagnóstico e o tratamento em casos de envenenamento por plantas (CHEEKE, 1998; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2002).

O uso de produtos derivados de plantas pode levar a diversos agravos à saúde, como reações alérgicas e de hipersensibilidade, reações tóxicas (como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade), efeitos adversos e efeitos mutagênicos, já que, muitas plantas que possuem poder curativo podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável, que podem desencadear reações adversas devido aos próprios componentes ou pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas (DE BONA et al., 2012).

A etapa de validação de uma planta envolve vários testes que visam confirmar a sua eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos. Os testes de margem de segurança são normalmente realizados em animais de laboratório e visam determinar efeitos da administração da planta em organismos animais. Uma das formas de proceder a avaliação toxicológica é através da administração de quantidade da planta ou doses do extrato em animais, podendo ser realizada a toxicidade aguda, subcrônica ou crônica. A toxicologia experimental desenvolve estudos para elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre sistemas biológicos e a avaliação dos efeitos decorrentes dessa ação. Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Testes de toxicidade genética são realizados rotineiramente para identificar potenciais agentes cancerígenos, genotóxicos e mutagênicos de células germinativas. Em baterias de testes de genotoxicidade *in vitro*, recomendados pelas agências reguladoras para detectar substâncias cancerígenas genotóxicas, inclui

pelo menos dois ou três procedimentos de teste, tais como teste de mutação reversa bacteriana, teste de danos cromossômicos e ensaio de mutação em células de mamíferos (KIM et al., 2013).

A implementação de estratégias de testes de genotoxicidade mais elevados, de rendimento em fases iniciais de descoberta de medicamentos, pode melhorar a priorização de compostos para testes avançados, otimizar prazos e permitir a reorientação dos recursos para a série química com perfis de segurança superiores. Além disso, essas atividades permitem refinar a relação estrutura-atividade, que, por sua vez, podem melhorar o desenvolvimento racional de drogas (SMART; LYNCH, 2012).

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

ALMEIDA, R. T.; VASCONCELOS, I.; NESS, R. L. L. Infecção micorrízica vesículo-arbuscular e nodulação de leguminosas arbóreas do Ceará, Brasil. **Ciência Agronômica**, v.17, n.1, p.89-97, 1986.

ALMEIDA, V. L. LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, A. P.; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; DE PAULA, R. C. Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth sobre a germinação e vigor. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.29, n.6, p.877-885, 2005.

AMARAL, E. A.; SILVA, R. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirêre - Revista Eletrônica da Pesquisa**, v.5, n.5, p.1-16, 2008.

BHAT, J. A.; KUMAR, M.; BUSSMANN, R. W. Ecological status and traditional knowledge of medicinal plants in Kedarnath Wildlife Sanctuary of Garhwal Himalaya, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.9, n.1, p.1-18, 2013.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de liquens**. Campo Grande, 2012, p. 110. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS.

BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; BOING, A. C. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.53, n.4, p.317-322, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Série B - Textos Básicos de Saúde, 2006. 60p.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, n.12, p.2141-2153, 2004.

CALLOU, M. J. A.; MIRANDA, R. C. M.; FEITOSA, T. R.; ARRUDA, F. V. F.; NASCIMENTO, M. S.; GUSMÃO, N. B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa caesalpinifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**, v.8, n.1, p.1-7, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Sabiá *Mimosa caesalpinifolia***. Circular Técnica 135 da Embrapa, p.1-7, 2007.

CENTRO NORDESTINO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS DA ASSOCIAÇÃO DE PLANTAS DO NORDESTE. **Banco de Imagens – Plantas – Sabiá**. Disponível em: http://www.cnip.org.br/banco_img/Sabia/index.html. Acesso em: 02 jul. 2015.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2 ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CINGI, M. R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in vitro**, v.5, n.1, p.119-125, 1991.

COLDITZ, G. A.; DEJONG, D.; HUNTER, D. J.; TRICHOPOULOS, D.; WILLETT, W. C. Harvard report on cancer prevention. Volume 1. Causes of human cancer. **Cancer Causes Control**, v.7, n.1, p.1-59, 1996.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; Moraes, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal Ethnopharmacology**, v.100, n.1, p.72-79, 2005.

DE BONA, A. P.; BATITUCCI, M. C. P.; ANDRADE, M. A.; RIVA, J. A. R.; PERDIGÃO, T. L. Estudo fitoquímico e análise mutagênica das folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) através do teste de micronúcleo em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.344-351, 2012.

DOLL, R.; PETO, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **Journal of the National Cancer Institute**, v.66, n.1, p.1191-308, 1981.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S. R.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v.2013, n.2013, p.1-9, 2013.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F. Fitossociologia de trechos do Complexo de Campo Maior, Campo Maior, PI, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.18, n.1, p.949-963, 2004.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.1, p.313-330, 2015.

FERREIRA, P. M. P.; ARAÚJO, E. J. F.; SILVA, J. N.; FREITAS, R. M.; COSTA, N. D. J.; OLIVEIRA, S. F. C.; PEREIRA, J. B. A.; PINHEIRO, J. A. F.; ABREU, M. C.; PESSOA, C. **Safety and Efficacy of *Moringa oleifera* Lamarck (1785) — Therapeutic and Toxicological Properties**. In: GOWDER, S.J.T. *Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science* » "Pharmacology and Therapeutics". Ed. InTech, Croacia. 2014. p.179-205.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n.3, p.1045-1058, 2011.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do horto da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES. **Natureza On Line**, v.3, n.1, p.19-24, 2005.

GÁLVEZ, M.; MARTÍN-CORDERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M.; CORTÉS, F.; AYUSO, M. J. Cytotoxic effect of *Plantago spp.* on cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.125-130, 2003.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.3, p.227-234, 2005.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.1, p.3864-3874, 1991.

HOLBECK, S. L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, v.40, n.1, p.785-793, 2004.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. **Methods**, v.42, n.1, p.377-387, 2007.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.

ISMAEL, G. F. V.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, n.1, p.81-91, 2008.

INSTITUTO SOCIEDADE, POPULAÇÃO E NATUREZA (ISPN). **Portal Cerratinga – Biomás**. Disponível em: <http://www.cerratinga.org.br/caatinga/>. Acesso em 10 jul. 2015.

KEAPRADUB, N.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; HOUGHTON, P. J. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. **Planta Medica**, v.65, n.1, p.311-315, 1999.

KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A.; LIMA, P. C. F.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. Preservação e uso da Caatinga. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 36p.

KIM, H. R.; PARK, Y. J.; SHIN, D. Y.; OH, S. M.; CHUNG, K. H. Appropriate *in vitro* methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. **Health Toxicology**, v.28, n.1, p.1-18, 2013.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. **Ecologia e conservação da Caatinga: uma introdução ao desafio**. In: Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: EDUFPE, 2003. p.13-16.

LEAL JÚNIOR, G.; SILVA, J. A.; CAMPELLO, R. C. B. **Proposta de manejo florestal sustentado do sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)**. Crato: IBAMA, 1999. 15p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 351p.

MACHADO, C. F. P.; MELO JÚNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.1, p.01-06, 2009.

MASOUDI-NEJAD, A.; BIDKHORIA, G.; ASHTIANIA, S. H.; NAJAFIA, A.; BOZORGMEHRA, J. H.; WANG, E. Cancer systems biology and modeling: microscopic scale and multiscale approaches. **Seminars in Cancer Biology**, v.30, n.1, p.60-69, 2015.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 126p.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? **Pharmaceutical Research**, v.27, n.1, p.950-61, 2010.

MILITÃO, G. C. G.; DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M. P.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of Cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.12, p.1479-1487, 2012.

MONÇÃO, N. B. N.; COSTA, L. M.; ARCANJO, D. D.; ARAÚJO, B. Q.; LUSTOSA, M. C.; RODRIGUES, K. A.; CARVALHO, F. A.; COSTA, A. P.; CITÓ, A. M. G. L. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, n.3, p.456–462, 2014.

NCI. **Nacional Cancer Institute**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/>. Acesso em: 30 jun. 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1002-1037, 2003.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.17, p.5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

PINILLOS, M. A.; GÓMEZ, J.; ELIZALDE, J.; DUEÑAS, A. Intoxicación por alimentos, plantas y setas. **Anales Sis San Navarra**, v.26, n.1, p.243-263, 2003.

RALPHS, M. H.; GARDNER, D. R.; PFISTER, J. A. A functional explanation for patterns of norditerpenoid alkaloid levels in tall larkspur (*Delphinium barbeyi*). **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n.7, p.1595-1607, 2000.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v.316, n.17, p.2713-2722, 2010.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R.; DRUMOND, M. A. Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) Árvore de múltiplo uso no Brasil. Comunicado Técnico 104 da Embrapa, p.1-3, 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003. 356p.

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. Fortaleza, 2013, p. 122. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

SANTOS, M. E. P.; MOURA, L. H.; MENDES, M. B.; ARCANJO, D. D.; MONÇÃO, N. B.; ARAÚJO, B. Q.; LOPES, J. A.; SILVA-FILHO, J. C.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, R. C.; CITÓ, A. M.; OLIVEIRA, A. P. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.164, n.1, p.120–128, 2015.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Use of medicinal plants by the population of Ariquemes, in Rondonia State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.244-250, 2008.

SHAH, U.; SHAH, R.; ACHARYAC, S.; ACHARYA, N. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.11, n.1, p.16-23, 2013.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Reviews**, v.3, n.9, p.701-708, 2003.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.2, p.443-451, 2013.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: A review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, n.1, p.193-207, 2011.

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SILVA, M. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpiniaefolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7. **South African Journal of Botany**, v.93, n.1, p.64-69, 2014.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos.** Teresina, 2015, p. 166. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí – UFPI.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.4, p.427-435, 2010.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1107-1112, 1990.

SMART, D. J.; LYNCH, A. M. Evaluating the genotoxicity of topoisomerase-targeted antibiotics. **Mutagenesis**, v.27, n.3, p.359-365, 2012.

SMITH, J. A.; NGO, H.; MARTIN, M. C.; WOLF, J. K. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. **Gynecologic Oncology**, v.98, n.1, p.141-145, 2005.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, n.2, p.308-312, 2004.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v.3, n.1, p.25-41, 2007.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.3, p.971-981, 2005.

TETIK, F.; CIVELEK, S.; CAKILCIOGLU, U. Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, n.1, p.331-346, 2013.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, H.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v.40, n.12, p.1635–1660, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VILAR, J. B.; FERRI, P. H.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, p.197-202, 2011.

WANG, L.; LIN, L.; YE, B. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.42, n.5, p.625-629, 2006.

CAPÍTULO I**Biologia e aplicações pré-clínicas do modelo experimental Sarcoma 180****(Artigo a ser submetido à Revista GEINTEC)**

Biologia e aplicações pré-clínicas do modelo experimental Sarcoma 180

DRUMOND, RR¹; DA COSTA, MP^{1,2}; CAVALCANTE, AACM¹; FERREIRA, PMP^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), *Campus* Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

²Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

³Laboratório de Cancerologia Experimental, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

RESUMO

Os modelos experimentais pré-clínicos são, particularmente, úteis para a compreensão da biologia dos tumores. Para testar novas terapias alvo-direcionadas, é essencial a utilização de modelos *in vitro* e *in vivo*, como o modelo experimental murino Sarcoma 180 (S180). O presente trabalho apresenta uma revisão sobre o modelo experimental S180, destacando sua biologia e as suas aplicações para a descoberta de novas substâncias antitumorais. Para tanto, realizou-se uma busca e análise de fontes primárias na literatura científica nas bases de dados *Scielo*, *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus* e Periódicos Capes, de 1966 até 2015 usando os seguintes descritores: “Sarcoma” e “Sarcoma 180”. As bases com maiores números de resultados para as buscas foram *Scopus* (103.988) e *PubMed* (66.078). O tumor S180 ou tumor de Crocker, descoberto em 1914, é indiferenciado e pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais; apresenta-se como massa sólida formada por células polimórficas, hiperplásicas, poliédricas, arranjadas em ninhos ou cordões, citoplasma basófilo e núcleo central e invade o músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Suas células possuem número variável de cromossomos em todos os estágios de desenvolvimento e em todas as formas de manutenção tumoral, com complemento cromossômico instável e poliplóide, variando de 20 a 480 cromossomos e, pelo menos, três cromossomos resultantes de translocações. Esse tumor é muito utilizado na investigação do mecanismo de ação de moléculas com potencial antitumoral, além de possuir possibilidade de uso em estudos de hipercalcemia, reabsorção óssea, metabolismo de lipídeos e de respostas imunológicas as neoplasias.

Palavras-chave: Sarcoma murino. Modelo tumoral. Oncologia experimental.

Biology and pre-clinical purposes of the experimental model Sarcoma 180

ABSTRACT

Preclinical experimental models are particularly useful for understanding the biology of tumors. To test new target targeted therapies, it is essential the use of models *in vitro* and *in vivo*, such as murine experimental model sarcoma 180 (S180). This paper presents an overview of the experimental model S180, highlighting its biology and its applications for the discovery of new anti-tumor substances. To this end, we carried out a search and analysis of primary sources in scientific literature in Scielo databases, PubMed, Science Direct, Scopus and Portal Periodicos Capes, from 1966 to 2015, using the following keywords: "sarcoma" and "sarcoma 180". The bases with larger numbers to the results of searches were Scopus (103.988) and PubMed (66.078). The S180 Crocker tumor or tumor discovered in 1914, is undifferentiated and can be transplanted by subcutaneous, intraperitoneal or intramuscular inoculation and grows rapidly at 90% to 100% of the animals; appears as a solid mass composed of polymorphic cells, hyperplastic, polyhedral, arranged in nests or cords, basophilic cytoplasm and core and invades the skeletal muscle, adipose tissue, nerves and blood vessels. Your cells have variable number of chromosomes in all stages of development and all forms of tumor maintenance, with unstable and polyploid chromosomal complement, ranging 20-480 chromosomes and at least three chromosomes resulting from translocations. This tumor is widely used in the investigation of action of molecules with potential anti-tumor mechanism, as well as having possible use in studies hypercalcemia, bone resorption, lipid metabolism and immune responses neoplasms.

Keywords: Murine Sarcoma. Tumor model. Experimental oncology.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como um conjunto de mais de 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de vários tipos presentes em um mesmo microambiente, geralmente se espalham pelos tecidos e órgãos adjacentes (metástase) para regiões distantes do organismo. Essas propriedades geralmente são ocasionadas por um acúmulo de mutações herdadas ou induzidas (radicais livres, luz ultravioleta, micro-organismos) em oncogenes, genes supressores de tumor e em genes reparadores de DNA (ácido desoxirribonucléico), o que caracteriza o câncer como doença genética (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; INCA, 2014; ROSKOSKI, 2014).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele e mucosas, ele é denominado carcinoma, o qual corresponde a maioria dos cânceres humanos. Eles surgem a partir da camada de células epiteliais que, sob condições normais, é separado por lâmina basal do tecido conjuntivo adjacente (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010; INCA, 2014). Se o câncer se origina em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem é classificado como sarcoma (INCA, 2014). A dificuldade em torno dos tumores sarcomatosos tem sido agravada por muitos autores que combinam sarcomas de tecidos moles com sarcomas ósseos, já que eles são duas entidades diferentes, mas continua, até hoje, levando a falhas e atrasos no diagnóstico, o que, por sua vez, implica na escolha de tratamentos inadequados (HUSSEIN; SMITH, 2005).

Os sarcomas são neoplasias que surgem de células mesenquimais e são responsáveis por cerca de 1% a 2% de todas as malignidades em adultos e por cerca de 15% dos casos em crianças, afetando cerca de 200.000 pessoas por ano em todo o mundo (TAYLOR et al., 2012; KELLEHER; VITERBO, 2013). A maioria dos sarcomas primários de partes moles origina-se nas extremidades (59%), seguidas pelo tronco (19%), retroperitônio (13%) e cabeça e pescoço (9%), como, a partir do músculo, gordura e nervos periféricos e de tecidos conjuntivos de sustentação como osso e cartilagem (CORNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2012).

Apesar de menos comuns, os sarcomas representam um desafio terapêutico quando atingem grandes proporções, pois são agressivos localmente e capazes de apresentar crescimento invasivo e destrutivo, recidiva local e metástases (FLEURY;

SANCHES, 2006; TONETO; LUCCHESI; REICHEL, 2013), variando, portanto, desde indolentes até altamente invasivos e metastáticos. Do ponto de vista molecular, eles têm sido tradicionalmente classificados em duas grandes categorias, cada uma das quais inclui clinicamente diversos sarcomas (TAYLOR et al., 2012). Primeiro, são os sarcomas com cariótipo quase diplóides e alterações genéticas simples, incluindo translocações ou mutações somáticas ativadoras específicas, caracterizados por uma única aberração genética recorrente (mutações somáticas) e tendem a ocorrer em pacientes mais jovens. O segundo subtipo inclui os sarcomas com várias aberrações cromossômicas, cariótipos complexos e desequilibrados. Estes tumores são tipificados pela instabilidade cromossômica, fato que favorece alterações genômicas em uma única célula tumoral, levando à heterogeneidade da população celular dentro da massa tumoral de um mesmo paciente. Essa instabilidade possivelmente surge por causa da perda de telômeros, que encurtam com sucessivas divisões celulares (CAMPISI, 2001; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; KELLEHER; VITERBO, 2013; DOW et al., 2015; MÉNIEL et al., 2015).

A maioria dos sarcomas com alterações genéticas simples são os sarcomas associados à translocação (aproximadamente um terço de todos os sarcomas). Estes tumores tendem a recidivar e, em alguns casos, apenas o único ponto de anomalia citogenética que está presente no início é mantido ao longo da sua evolução clonal. Em contraste com os sarcomas associados à translocação, alguns sarcomas com cariótipos complexos podem surgir de uma forma menos agressiva e passar por inúmeras fases de progressão, acompanhados por aumento da complexidade do genoma (TAYLOR et al., 2012).

Para entender a complexa biologia do câncer, diversas linhagens de camundongos e de células são utilizadas como modelos experimentais (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Além das linhagens de células, vários outros tipos de modelos têm sido utilizados e são susceptíveis de forma semelhante aqueles *in vivo*. Estes incluem estudos *ex-vivo* de culturas de fatias de tecido que preservam o microambiente do tumor original (MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; TAYLOR et al., 2012).

Uma característica muito útil de algumas linhagens tumorais é que, além de serem cultivadas *in vitro* há a possibilidade de estudar seu comportamento *in vivo* por meio da inoculação destas células em modelos animais, sendo instrumentos importantes para validar o papel etiológico de candidatos a oncogenes e genes supressores tumorais na iniciação e progressão de tumores e úteis na descoberta de

como estas alterações genéticas contribuem para a biologia dos tumores (CRUZ et al., 2009). Quanto ao teste de novos protótipos e candidatos farmacologicamente ativos, é essencial a utilização de modelos *in vivo* de sarcomas, como, por exemplo, o Sarcoma 180 (TAYLOR et al., 2012), pois, nem sempre, os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, sendo necessário estudar os efeitos de compostos em sistemas biológicos completos e mais complexos (RIOS, 2013).

O presente trabalho apresenta uma revisão sobre o modelo experimental Sarcoma 180, destacando a biologia e as suas principais aplicações biomédicas com o intuito de proporcionar uma fonte de informação para os pesquisadores interessados em utilizá-lo como modelo experimental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para uma revisão confiável, apenas recursos primários foram utilizados. Foi realizada uma busca e análise de documentos (artigos, comunicações curtas, teses e dissertações) encontrados na literatura científica e publicados em português, inglês ou espanhol nas bases de dados *Scielo*, *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus* e Periódicos Capes, de 1966 até 2015, e indexados pelos seguintes descritores: “Sarcoma” e “Sarcoma 180”. Foram excluídos, por não se enquadrarem nos critérios do estudo proposto, os documentos que não continham os descritores no título ou no resumo. Também não foram utilizados textos incompletos e artigos que não estavam disponíveis na íntegra e publicações que abordavam focos não relevantes, fugindo da temática que foi abordada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso na última década, após a constatação que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (KAMB, 2005; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009). Células tumorais de murino são muito exploradas como ferramentas pré-clínicas em pesquisas de novas substâncias químicas com propriedades antitumorais (FERREIRA et al., 2015). Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a

compreensão da intrincada patogênese do câncer em seres humanos, uma vez que a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos foi fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Esses organismos são modelos acessíveis, prolíferos, com período de gestação curto, de fácil domesticação e manutenção e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos. Logo, o camundongo de laboratório se tornou o modelo experimental de mamífero mais usado e mais acessível, compartilhando genes, sistemas orgânicos e sistemas fisiológicos com os seres humanos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; RANGARAJAN et al., 2004; KAMB, 2005; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; ARAÚJO et al., 2015).

Nesse trabalho, o levantamento de dados quanto aos descritores utilizados (Sarcoma e Sarcoma 180) revelou um total de 228.706 documentos (**Tabela 1**). As bases com maiores números de resultados foram *Scopus* (103.988) e *PubMed* (66.078).

Tabela 1 – Número de artigos disponíveis nas bases de dados por palavras-chave (Sarcoma e Sarcoma 180).

Descritores	Bases de Dados					TOTAL
	Capes	Science Direct	PubMed	Scielo	Scopus	
Sarcoma	43724	13273	64318	570	99645	221530
Sarcoma 180	524	514	1760	35	4343	7176
TOTAL	44248	13787	66078	605	103988	228706

Fonte: Autoria própria (2015).

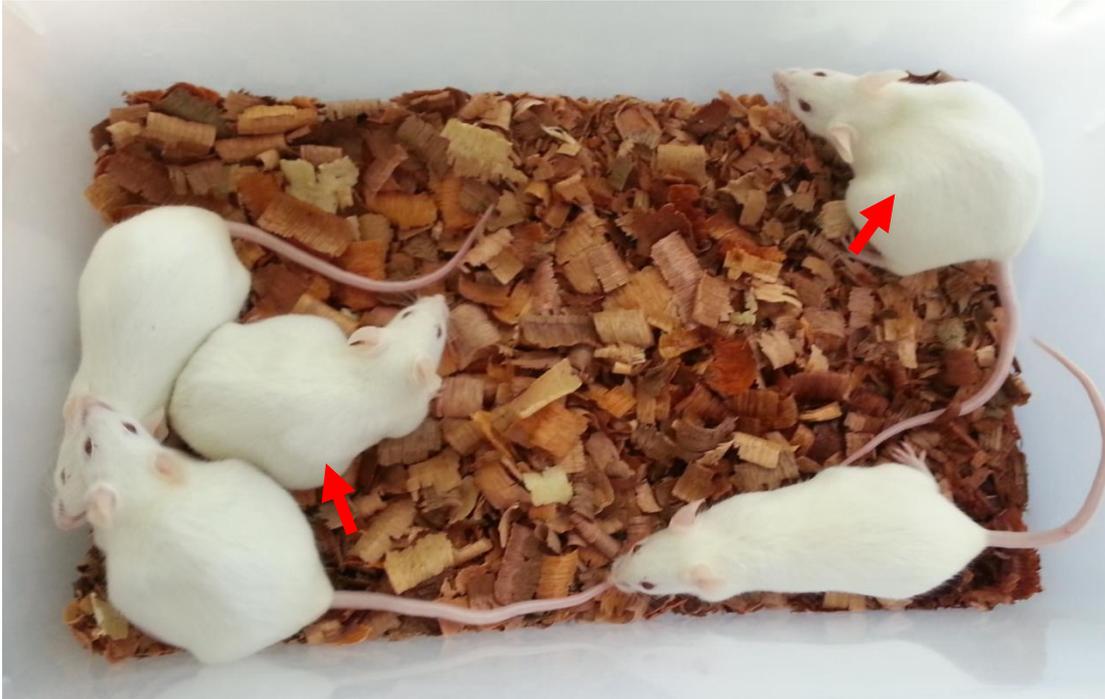
O Sarcoma 180 (S180) foi um dos primeiros tumores experimentais de camundongos a ser transplantado em animais. Inicialmente, este tumor, descoberto em 1914, foi identificado como uma massa sólida espontânea de linhagem epitelial na axila direita de um camundongo albino e denominado de Tumor de Crocker, por ter sido descoberto pelo Dr. William H. Woglom no Crocker Laboratory (Columbia University, New York). Inicialmente, o S180 foi classificado como carcinoma mamário (origem epitelial). Em estudos morfológicos, com microscopia óptica e eletrônica, mostrou contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, sugerindo que se tratava de um carcinoma, e não possuía qualquer partícula viral (SUGIURA, 1965; ZUCKERBERG, 1973; OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MACHADO;

MELO JÚNIOR, 2009). Após várias transplantações subcutâneas, verificaram que as células do S180 não expressam laminina e, desta forma, não podem ter origem epitelial, e que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180. Após assumir a forma sarcomatosa, por volta de 1919, manteve-se como um tumor indiferenciado, sem alterações até os dias de hoje (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; OLIVEIRA, 2012; RIOS, 2013).

Embora o tumor tenha sido repassado para diversos laboratórios ao redor do mundo, a linhagem de células tumorais do S180 pode ser obtida pela ATCC (*American Type Culture Collection*), onde recebe o código TIB-66. Este banco de células possui diversos tipos celulares de diferentes animais, fornecendo também as informações citogenéticas de muitos deles (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). No entanto, não são disponibilizadas as informações cariotípicas referentes ao S180.

As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras: a) células inoculadas na cavidade intraperitoneal, que se desenvolvem formando um tumor ascítico (em suspensão, **Figura 1**); b) células neoplásicas inoculadas via subcutânea ou no músculo (**Figuras 2 e 3**), formando tumores sólidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2015).

Figura 1 – Aspecto externo de camundongos portadores de Sarcoma 180 na região intraperitoneal no oitavo dia após a inoculação de células neoplásicas.



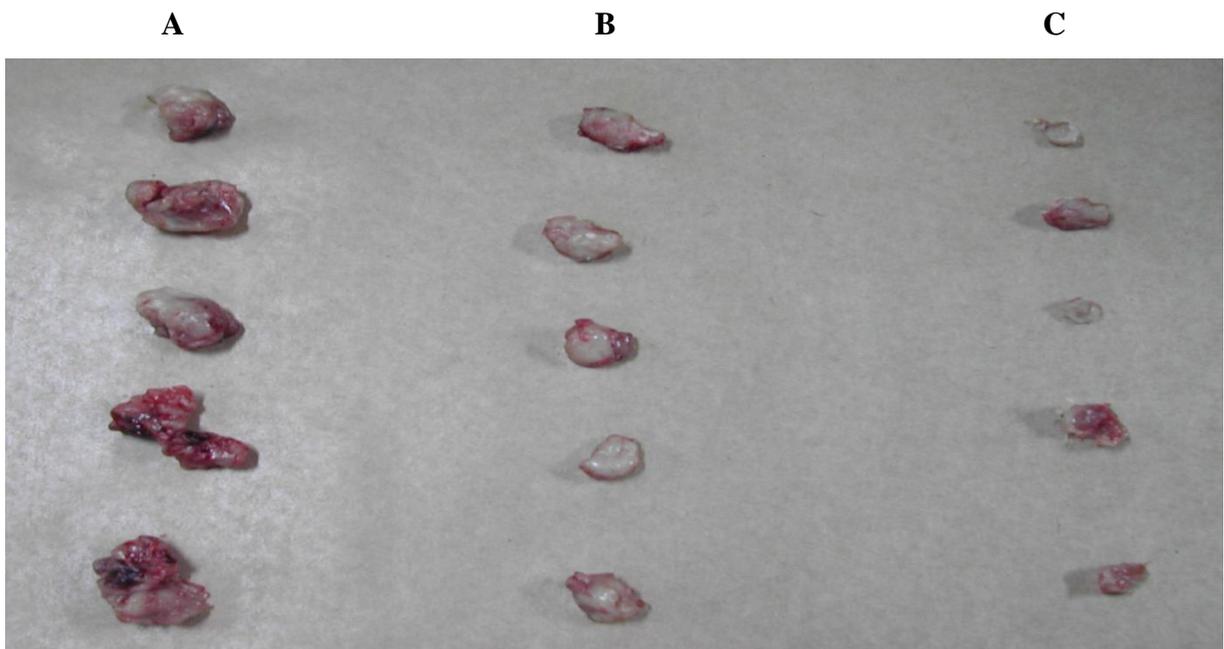
Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 2 – Aspecto externo de camundongos portadores de Sarcoma 180 na região axilar no oitavo dia após a inoculação de 4×10^6 células/mL. Camundongos sacrificados com tiopental (150 mg/kg).



Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 3 – Aspecto macroscópico de tumores Sarcoma 180 dissecados após inoculação na axila de camundongos albinos *Swiss*, seguida de tratamento de 7 dias consecutivos. A representa tumores do grupo controle negativo (dimetilsulfóxido 5%); B representa tumores do grupo controle positivo (5-Fluorouracil, 25 mg/Kg/dia) e C são tumores removidos de animais tratados com uma substância antitumoral de origem natural).



Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Histologicamente, o S180 apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas arranjadas em ninhos ou cordões, citoplasma basófilo e núcleo central, (ZUCKERBERG, 1973). O pleomorfismo é acentuado. Há estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor, embora, frequentemente, ocorra necrose central. Após sucessivos implantes subcutâneos, o padrão histológico torna-se misto apresentando aspecto de carcinoma e de sarcoma. O tumor invade o músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MAGALHÃES et al., 2010; MILITÃO et al., 2012).

Apesar da maioria dos tumores sólidos de S180 desenvolverem necrose a partir da 3ª semana de implante (PEREIRA; CHAVES, 1983), apenas uma semana de crescimento tumoral é o bastante para o surgimento de necroses, como acontece nos grupos experimentais tratados apenas com salina fisiológica. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a forma sólida do S180 caracteriza-se por um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias de transplante (SCHABEL et al., 1977), sendo, portanto, a capacidade de oxigenação dos vasos sanguíneos locais e daqueles em formação (angiogênese) ultrapassada pelo aumento da massa neoplásica (PADERA et al., 2004). A necrose de coagulação que ocorre principalmente nas áreas centrais do tumor é determinada pela desnaturação da maioria das proteínas celulares (inclusive as lisossômicas) devido à queda acentuada no pH celular durante o processo de lesão por hipóxia ou isquemia. Nestes casos, o citoplasma celular se torna bastante eosinofílico e, como a maioria das enzimas autolíticas foi desnaturada, a arquitetura tecidual é mantida por alguns dias até digestão e remoção do tecido necrótico por leucócitos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

O número de cromossomos observados em células do S180 é variável em todos os estágios de desenvolvimento do tumor e em todas as formas de manutenção tumoral. Estudos demonstraram que o complemento cromossômico do S180 é altamente instável, variando de 20 a 480 cromossomos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Chakrabarti; Roychowdhury (1980) descreveram o número modal de 75 cromossomos, enquanto que outros autores observaram o número modal de 73 cromossomos (GHOSH; CHAUDHURI, 1984). Agrupando-se todos os dados foram encontradas metáfases com números cromossômicos variando entre 16 e 232 e número modal de 68 cromossomos, o que indica que a linhagem celular S180 é composta por uma população heterogênea de células (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008).

Também foram encontrados três cromossomos resultantes de translocações, os quais foram denominados marcadores A, B e C. O marcador A é um cromossomo com dois braços. Pelo padrão de banda-G, foi verificado que o braço maior deste marcador é derivado do cromossomo 6 e o braço menor, provavelmente, do cromossomo 9. A técnica de banda-C revelou dois blocos heterocromáticos, próximos um do outro, localizados na região central do cromossomo. No marcador B foram encontrados dois blocos heterocromáticos nas regiões terminais do cromossomo. Provavelmente, os cromossomos 9 ou 10 e 13 estão envolvidos nesta translocação. O marcador C também apresentou dois blocos heterocromáticos, um na região terminal e outro na região intersticial, próximo ao fim do cromossomo. O padrão de banda-G indica que os cromossomos 14 e 19 podem estar envolvidos nesta translocação (GHOSH; CHAUDHURI, 1984).

O núcleo de células de S180 apresenta polimorfismo de tamanho, acompanhado por diferenças no tamanho da célula. Uma consequência fisiológica da poliploidia é o aumento no tamanho da célula, pois o volume da célula aumenta linearmente com cada complemento cromossômico extra. Este fato é explicado pela maior dosagem gênica encontrada nas células poliplóides, o que acarreta uma elevação na síntese de proteínas (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008).

Um dos aspectos mais característicos das células sarcomatosas é a basofilia pronunciada do citoplasma. Uma vez que essa basofilia citoplasmática pode ser abolida por tratamento com a ribonuclease, presume-se que a mesma seja devido à presença de ácido nucléico. A basofilia é geralmente difusa. O material basófilo parece ser mais fortemente concentrado na periferia e extremidades da célula, que são excepcionalmente alongadas, ou seja, as células perdem a sua basofilia abruptamente na área mais necrótica. Algumas células, especialmente as células pequenas, mostram todo o citoplasma intensamente basófilo, mas, em células consideradas mais típicas, a basofilia ou é muito menos intensa ou falta completamente em uma área esférica de tamanho variável perto do núcleo. Nesta área há concentração de lipóide. As células coradas para observação do citoplasma basofílico não mostram o lipóide como tal, mas a sua localização é característica, indicada por esta área esférica muito pálida (WORLEY; SPATER, 1952).

Assim como em outras neoplasias, a hipercalcemia, frequentemente aparece nos estados avançados de S180. Essa hipercalcemia é resultante do aumento de reabsorção óssea e parece ser derivada da ação de células tumorais produtoras do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-

6 (IL-6) e por ação de fatores ainda desconhecidos, como proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo que estes fatores desconhecidos causam reabsorção óssea por uma via que é independente de PGE2 (Prostaglandina E2) (SUZUKI; YAMADA, 1994).

Células tumorais de murino são usadas como ferramentas pré-clínicas em pesquisas de novas substâncias químicas com propriedades antitumorais. Ainda em 1922, o tumor de S180 e o carcinoma de ratos chamado Flexner-Jobling foram utilizados para avaliar a influência de sais inorgânicos sobre o crescimento tumoral (SUGIURA, 1965; ZUCKERBERG, 1973; OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). O S180 é muito utilizado em diversos estudos biomédicos, como a atividade antiproliferativa de substâncias sobre células tumorais e a investigação do mecanismo de ação de compostos biologicamente ativos (ITOKAWA et al., 1990; BEZERRA et al., 2008, 2015; FERREIRA et al., 2015).

Pesquisadores estudam os efeitos de fármacos ou candidatos a tais em células de S180 *in vitro* em relação à concentração da droga e a duração da exposição ao fármaco. Estas investigações podem mostrar se essa letalidade é dependente da duração da exposição e se existe uma relação concentração-resposta (RITCH et al., 1981; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA, 2012; RIOS, 2012; FERREIRA et al., 2015). A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou o aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores diretamente relacionados à atividade antitumoral. O melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL et al., 1977). Alguns estudos da atividade antitumoral em S180 podem ser observados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Relação de alguns estudos da atividade antitumoral *in vivo* usando Sarcoma 180 como modelo experimental.

Substância	Inibição Tumoral (%)	Referência
Compostos à base de platina (8 mg/kg/dia)	83 a 100	ROSENBERG; VAN CAMP (1970)
Piplartina e Piperina (<i>Piper</i> sp.)	28,7 e 52,3 para piplartine e 55,1 e 56,8 para piperina	BEZERRA et al. (2006)
SVLV (<i>Sargassum vulgare low viscosity</i>) e SVHV (<i>S. vulgare high viscosity</i>) (100 mg/m ² /dia)	74,8 e 88,8	SOUSA et al. (2007)
Piperlonguminina (<i>Piper tuberculatum</i>) (25 e 50mg/kg/dia)	38,7 e 40,7	BEZERRA et al. (2008)
Pisosterol (50 ou 100 mg/m ²) de <i>Pisolithus tinctorius</i>	43,0 e 38,7	MONTENEGRO et al. (2008)
Extrato bruto de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (50 mg/kg/dia)	52,8	MACHADO; MELO JÚNIOR (2009)
1,2-dihidroxibenzeno (200 mmol/kg/dia)	70,0	PESSOA et al. (2010)
Proteínas laticíferas de <i>Calotropis procera</i> (5 mg/kg/dia)	51,8	OLIVEIRA et al. (2010)
Extrato de acetona e de acetato de etila de <i>Calotropis procera</i> (250 mg/kg/dia)	53,1 e 64,3	MAGALHÃES et al. (2010)
Óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i> (50-200 mg/kg/dia)	43,4 e 54,2 para tratamento i.p. (50 e 100 mg/kg/dia) e 6,6 e 42,8 para o tratamento oral (100 e 200 mg/kg/dia)	BRITTO et al. (2012)
(2β, 3β, 16α, 20 (R), 25-pentahidroxi-22-oxocucurbita-5-en) (25 mg/kg/dia)	52,0	MILITÃO et al. (2012)
Extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> L. (50 mg/kg/dia)	90,0	OLIVEIRA (2012)
Óleo essencial de <i>Xylopi frutescens</i> (50 ou 100 mg/kg/dia)	31,0 e 37,5	FERRAZ et al. (2013)
Extrato acetônico das sementes de <i>Annona muricata</i> L. (30 mg/kg/dia)	48,4	RIOS (2013)
Óleo essencial das folhas de <i>Mentha x villosa</i> (50-200 mg/kg/dia)	29,4 e 40,5 para tratamento i.p. (50 e 100 mg/kg/dia) e 25,0 e 45,2 para o tratamento oral (100 e 200 mg/kg/dia)	AMARAL et al. (2015)
Talidomida (50 mg/kg/dia)	53,5	FERREIRA et al. (2015)

Fonte: Autoria própria (2015).

Opcionalmente, em testes *in vivo*, também podem ser utilizados camundongos geneticamente modificados, especificamente preparados, de linhagem atímicas, ou seja, sem linfócitos T maduros como a linhagem Balb-c *nu/nu*. Nesses animais são implantadas células tumorais humanas no tecido subcutâneo (também chamado de modelo xenográfico) e são acompanhados quanto à regressão tumoral após a aplicação de substâncias quimioterápicas. O modelo xenográfico possui custo muito elevado, o que o torna restrito a certos Centros de Pesquisa (MATSUZAKI et al., 2006). Esse modelo também têm outras limitações: 1) algumas anomalias genéticas presentes em tumores primários não estarão presentes em xenotransplantes, não permitindo o estudo do desenvolvimento tumorigênico e, inversamente, passagens em série, podem introduzir alterações adicionais que não refletem os tumores primários; 2) o câncer é tratado como uma doença celular isolada e não como o resultado da interação tumor-hospedeiro (PANTALEÃO; LUCHS, 2010; TAYLOR et al., 2012). De fato, muitos tratamentos que inicialmente se mostraram promissores nestes modelos não se traduziram com sucesso na clínica (TAYLOR et al., 2012). Dessa maneira, as vantagens do modelo S180 prevalecem, favorecendo melhores resultados nos estudos da atividade antitumoral *in vivo*, uma vez que todas as respostas sistêmicas se fazem presentes, inclusive a imunidade, já que, a modulação do sistema imunitário é um conceito emergente no controle do crescimento tumoral.

Embora existam muitos mecanismos subjacentes, é muito importante a função que o sistema imunitário desempenha em células tumorais, minimizando a metástase através da atenuação da expressão de citocinas pró-angiogênicas e regulando a expressão de fatores endoteliais que são cruciais para o crescimento do processo angiogênico em metástase. Alternativamente, a imunidade antitumoral mediada pelo interferon- γ e interleucina-2 são as características mais importantes identificados até à data. Em vista disso, a descoberta de agentes imunomoduladores é uma tarefa que está atualmente recebendo muita atenção, inclusive sendo testada em modelo experimental de S180 (STREET; CRETNEY; SMYTH, 2001; HASTIE et al., 2008; PESSOA et al., 2010). O estudo de SATO et al. (2005), mostrou que a resposta imunológica a um tumor inclui a observação de infiltração linfóide, fibrose peritumoral, crescimento e tamanho do tumor do S180.

Uma mudança observada em animais portadores de S180 é a diminuição específica da atividade da lipoproteína lipase (LPL) do tecido adiposo. Uma diminuição na atividade da LPL do tecido adiposo é acompanhada por aumentos na

atividade do coração e do próprio tumor. Depleção de lipídeos é, frequentemente, uma situação observada em animais portadores de tumor e em humanos com câncer, mas a razão para este esgotamento não é totalmente compreendida. Vários mecanismos possíveis podem estar envolvidos, incluindo as alterações nas taxas de deposição ou mobilização de lipídeos ou em ambas. A caquexia, que acomete 80 % a 90 % de pacientes oncológicos adultos e pode acabar sendo um fator contribuinte ou mesmo causador de óbito, acompanha esse esgotamento energético é uma síndrome que se caracteriza por perda de peso, lipólise, atrofia muscular, anorexia, náusea crônica e astenia, contribuindo de maneira significativa para uma pior qualidade de vida, maior morbidade e mortalidade (SILVA, 2006). A descoberta de alterações nessa enzima abriu um novo campo de aplicação do modelo S180 com possibilidade de estudar a ação enzimática da LPL em camundongos transplantados com o S180 (MASUNO, 1984).

Um resumo das principais aplicações do S180 como modelo experimental pode ser observado no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Aplicações do modelo experimental Sarcoma 180.

- Citotoxicidade *in vitro*
- Atividade antitumoral *in vivo*
- Respostas imunológicas
- Hipercalcemia e reabsorção óssea
- Depleção de Lipídeo

Fonte: Autoria própria (2015).

4 CONCLUSÃO

Apesar do grande número de estudos que mencionam o Sarcoma 180, poucos são aqueles que esclarecem sobre a biologia tumoral e informações mais específicas desse modelo experimental. Entretanto, mais estudos são necessários, já que o Sarcoma 180 é um dos modelos tumorais *in vivo* mais utilizados na atualidade na busca de novas potencialidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. G.; FONSECA, C. S.; SILVA, T. K. M.; ANDRADE, L. N.; FRANCA, M. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; SOUZA, D. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. O.; CARVALHO, ADRIANA A.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.67, n.8, p.1100-1106, 2015.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- ARAUJO, E. J. F.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOMÉ, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. G. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.3, p.1791-1807, 2015.
- BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.6, p.801-807, 2006.
- BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.2, p.156-163, 2008.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.5, p.599-607, 2008.
- BRITTO, A. C.; DE OLIVEIRA, A. C.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v.78, n.5, p.409-414, 2012.
- CAMPISI, J.; KIM, S. H.; LIM, C. S.; RUBIO, M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. **Experimental Gerontology**, v.36, n.10, p.1619-1637, 2001.
- CHAKRABARTI, A.; ROYCHOWDHURY, J. Chromosome analysis with special reference to centromeric heterochromatin and ploidy variation in mouse Sarcoma-180 cells. **Cytology**, v.45, n.1-2, p.177-184, 1980.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.11-23, 2007.

CORMIER, J. N.; PEARSON, A. S.; METERISSIAN, S. H.; TANABE, K. K. **Bone and soft tissue sarcoma**. In: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. The MD Anderson surgical oncology handbook. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 322 p.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. Modelos Experimentais em Oncologia: o contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.15, n.4, p.669-682, 2009.

DOW, L. E.; O'ROURKE, K. P.; SIMON, J.; TSCHAHARGANEH, D. F.; VANES, J. H.; CLEVERS, H.; LOWE, S. W. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. **Cell**, v.161, n.7, p.1539-1552, 2015.

FERRAZ, R. P.; CARDOSO, G. M.; DA SILVA, T. B.; FONTES, J. E.; PRATA, A. P.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopi frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v.141, n.1, p.196-200, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.1, p.313-330, 2015.

FLEURY, L. F. F. J.; SANCHES, J. A. J. Primary cutaneous sarcomas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.3, p.207-221, 2006.

GHOSH, S.; CHAUDHURI, A. Analysis of three whole-arm translocations in a mouse sarcoma cell line. **Cytogenetics and cell genetics**, v.38, n.3, p.161-164, 1984.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

HASTIE, C.; MASTERS, J. R.; MOSS, S. E.; NAABY-HANSEN, S. Interferon- γ reduces cell surface expression of annexin 2 and suppresses the invasive capacity of prostate cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.18, p.12595-12603, 2008.

HUSSEIN, R.; SMITH, M. A. Soft tissue sarcomas: are current referral guidelines sufficient? **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v.87, n.3, p.171-173, 2005.

INCA. **Tipos de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em: 13 mar. 2015.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n.12, p.3384-3388, 1990.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.2, p.161-165, 2005.

KELLEHER, F. C.; VITERBO, A. Histologic and Genetic Advances in Refining the Diagnosis of "Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma". **Cancers**, v.5, n.1, p.218-233, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, M. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004. 1525 p.

MACHADO, C. F. P.; MELO JÚNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.1, p.01-06, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MASUNO, H.; TSUJITA, T.; NAKANISHI, H.; YOSHIDA, A.; FUKUNISHI, R.; OKUDA, H. Lipoprotein lipase-like activity in the liver of mice with Sarcoma 180. **Journal of Lipid Research**, v.25, n.5, p.419-427, 1984.

MATSUZAKI, W. S.; RODRIGUES, F. C. M.; MALHEIROS, C. A.; RAHAL, F. Uso de teste de químico-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no câncer gástrico avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.4, p.228-234, 2006.

MÉNIEL, V.; MEGGES, M.; YOUNG, M. A.; COLE, A.; SANSOM, O. J.; CLARKE, A. R. Apc and p53 interaction in DNA damage and genomic instability in hepatocytes. **Oncogene**, v.34, n.31, p.4118-4129, 2015.

MILITÃO, G. C. G. DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of cucurbitacina isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.12, p.1479-1487, 2012.

MONTENEGRO, R. C.; FEIO, F. R. A.; PINHO, P. M. R.; NEGREIROS, N. A. A. P.; SILVA, B. F.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biol Pharm Bull**, v.31, n.3, p.454-457, 2008.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** Fortaleza, 2012, p. 174. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, v.382, n.2, p.139-49, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. Uberlândia, 2008, p. 97. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (MG).

PADERA, T. P.; STOLL, B. R.; TOOREDMAN, J. B.; CAPEN, D.; DI TOMASO, E.; JAIN, R. K. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. **Nature**, v.427, n.6976, p.695, 2004.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.4, p.439-445, 2010.

PEREIRA, F. B. C.; CHAVES, F. B. Evolution of Sarcoma 180 in mice treated with hyperchlorinated water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, n.2, p.209-214, 1983.

PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, S. M.T.; COELHO, L. C.D.; HERNANDES, M. Z.; LEITE, A. C.L.; DE SIMONE, C. A.; COSTA, V. M. A.; SOUZA, V. M.O. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. **Chem Med Chem**, v.5, n.4, p.523–528, 2010.

RANGARAJAN, A.; HONG S. J.; GIFFORD, A.; WEINBERG, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. **Cancer Cell**, v.6, n.2, p.171-183, 2004.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. A. Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.1, p.952-959, 2003.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v.316, n.17, p.2713-2722, 2010.

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. Fortaleza, 2013, p. 122. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

RITCH, P.; GLAZER, R. I.; CUNNINGHAM, R. E.; SHACKNEY, S. E. Kinetic Effects of Sangivamycin in Sarcoma 180 *in Vitro*. **Cancer Research**, v.41, n.5, p.1784-1788, 1981.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, v.30, n.6, p.1799-1802, 1970.

ROSKOSKI, R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: structures and small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v.87, n.1, p.42-59, 2014.

SATO, D. Y.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic Medication. **Homeopathy**, v.94, n.1, p.26-32, 2005.

SCHABEL, F. M.; GRISWOLD JR, D. P.; LASTER JR, W. R.; CORBETT, T. H.; LLOYD, H. H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v.1, n.4, p.411-435, 1977.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.1, p.59-77, 2006.

SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ROCHA FILHO, F. D.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, v.69, n.1, p.7-13, 2007.

STREET, S. E.; CRETNEY, E.; SMYTH, M. J. Perforin and interferon-activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. **Blood**, v.97, n.1, p.192-197, 2001.

SUGIURA, K. Tumor transplantation. In: GAY, W. I. **Methods of animal experimentation**. New York: Academic Press, 1965. 357p.

SUZUKI, K.; YAMADA, S. Ascites sarcoma 180, a tumor associated with hypercalcemia, secretes potent bone-resorbing factors including transforming growth factor interleukin-1 α and interleukin-6. **Bone Miner**, v.27, n.3, p.219-233, 1994.

TAYLOR, B. S.; BARRETINA, J.; MAKI, R. G.; ANTONESCU, C. R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v.11, n.8, p.541–557, 2011.

TONETO, M. G.; LUCHESE, I. C.; REICHEL, C. L. Lipossarcoma Gigante de Retroperitônio. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, n.2, p.255-260, 2013.

WORLEY, L. G.; SPATER, H. W. The Cytoplasmic Cytology of Sarcoma 180. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.93, n.4, p.413-425, 1952.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, n.1, p.2278-2282, 1973.

CAPÍTULO II

Potencial citotóxico e antitumoral da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth

(Artigo a ser submetido à Revista Journal of Ethnopharmacology)

Potencial citotóxico e antitumoral da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth

DRUMOND, RR¹; SOUSA, IJO³, SOUSA, AN³, GOUDINHO, AF³; MONÇÃO, NBN⁴, CITÓ, AMGL^{1,4}; PESSOA, CO⁵; FERREIRA, PMP^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

² Departamento de Biofísica e Fisiologia, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

³ Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

⁵ Departamento de Biofísica e Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), CEP: 60430-270, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e micro-organismos, no campo da oncologia propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Além de diversas finalidades, a planta *Mimosa caesalpinifolia* é útil na medicina tradicional. É amplamente utilizada pela população na forma de infusões para o tratamento de feridas, bronquites, como anti-inflamatório e anti-hipertensivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo* da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. caesalpinifolia* Benth em células tumorais e em animais transplantados com o Sarcoma 180 (S180). A FDCM foi avaliada quanto a sua capacidade citotóxica *in vitro* frente a 4 linhagens de células tumorais mantidas em cultura pelo método do MTT e frente ao S180, pelo ensaio Alamar Blue, após 72 h de exposição. O efeito da FDCM sobre a viabilidade das células do S180 foi analisado através da exclusão por Azul de Tripán, nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL. A genotoxicidade foi avaliada em células do S180 pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese, nas mesmas concentrações do teste de viabilidade. Para o teste *in vivo*, a FDCM foi administrada nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia, durante 7 dias consecutivos por via intraperitoneal em camundongos transplantados com o S180. A FDCM apresentou CI_{50} variando entre 4,7 e 7,1 µg/mL contra as linhagens tumorais e 29,0 µg/mL em células de S180, além de diminuir significativamente o número de células viáveis. Não foi genotóxica, pois não induziu, de forma significativa, a formação de micronúcleos, porém, mostrou que é capaz de provocar anormalidades nucleares, com a formação de pontes nucleoplásmicas. Além disso, confirmou a sua citotoxicidade induzindo apoptose e necrose em células do S180. No teste *in vivo*, foram obtidos percentuais de inibição tumoral de $64,8 \pm 5,3 \%$ e $80,0 \pm 8,4\%$, para 50 e 100 mg/Kg/dia, respectivamente, em relação ao controle negativo. A FDCM mostrou-se promissora para a atividade antitumoral em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, em células tumorais e em animais transplantados com o S180.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Atividade Antitumoral. *Mimosa caesalpinifolia*.

Cytotoxic and anti-tumor potential of the bark of the plant stem *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth

ABSTRACT

The twentieth century had a breakthrough in the research of natural products, especially plants and microorganisms in the oncology field enabling the discovery of several substances currently used in anti-cancer therapy. In addition to various purposes, *Mimosa caesalpiniiifolia* plant is useful in the traditional medicine. It is widely used by the public as infusion for the treatment of wounds, bronchitis, as anti-inflammatory and antihypertensive. This study aimed to evaluate the cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of dichloromethane fraction (MGDF) plant stem bark *M. caesalpiniiifolia* Benth in tumor cells and in animals transplanted with sarcoma 180 (S180). The MGDF was evaluated as to its cytotoxic ability *in vitro* against four tumor cell lines maintained in culture by the MTT method, and opposite S180, by Alamar Blue assay after 72 h of exposure. The effect of MGDF S180 on the viability of the cells was assessed by Trypan Blue exclusion, at concentrations of 5, 25 and 50 µg/mL. Genotoxicity was evaluated in S180 cells by micronucleus test with cytokinesis blockade at the same concentrations the viability test. For *in vivo* testing, MGDF was administered at doses of 50 and 100 mg/kg/day for 7 consecutive days intraperitoneally into mice transplanted with S180. The MGDF showed IC₅₀ ranging between 4.7 and 7.1 µg/mL against tumor cell lines and 29.0 µg/mL in S180 cells and significantly decrease the number of viable cells. There was genotoxic as it did not induce significantly the formation of micronuclei, however, he showed that it is capable of causing nuclear abnormalities, with the formation of bridges nucleoplasmics. Furthermore, it confirmed the cytotoxicity inducing apoptosis and necrosis in S180 cells. In the *in vivo* test, were obtained percentage inhibition of tumor 64.8 ± 5.3 % and 80.0 ± 8.4% for 50 and 100 mg/kg/day, respectively, relative to the negative control. The MGDF has shown promise for antitumor activity in tests *in vitro* and *in vivo* on tumor cells and in animals transplanted with S180.

Keywords: Cytotoxicity. Antitumor activity. *Mimosa caesalpiniiifolia*.

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, cerca de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer em todo o mundo, sete milhões de pacientes morrem de câncer e 25 milhões de pessoas vivem atualmente com o diagnóstico de câncer (POPAT; MCQUEEN; FEELEY, 2013; TRAEBERT et al., 2013).

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Pesquisa sobre o câncer tem se concentrado em elucidar mecanismos de progressão do câncer para um melhor diagnóstico e tratamento (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos (INCA, 2014).

Apesar dos avanços de terapias alvo-dirigidas, a quimioterapia continua sendo a linha de frente no tratamento de neoplasias malignas. Evidências mostram que o custo do câncer está se tornando, ou já se tornou inacessível em muitos países, por conta da quantidade e do valor de cada medicamento (CHALKIDOU et al., 2014). Mostrando, assim, que os custos de tratamento com o câncer têm aumentado rapidamente e que todos os sistemas de saúde têm de enfrentar a questão do acesso à inovação terapêutica do câncer bem como o financiamento de fármacos extremamente caros (BONASTRE et al., 2014). Dessa forma, a introdução de fármacos inovadores é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes (OLIVEIRA et al., 2008).

Usando a bioprospecção como ferramenta de estudo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute of United States*, NCI-US) avaliou 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de plantas e identificou importantes compostos antitumorais que estão atualmente sendo usados na clínica tais como paclitaxel, docetaxel, vimblastina, vincristina, vindesina, camptotecina, irinotecano, etoposídeo e tenoposídeo (SRIVASTAVA et al., 2005). De fato, cerca de 64% das drogas utilizadas atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em biodiversidade, que é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, portanto, é potencial fonte de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga é, provavelmente, o mais desvalorizado e mal conhecido botanicamente, sendo o tipo de vegetação que cobre a maior parte da área com clima semiárido da região Nordeste do Brasil. Esse bioma contém uma grande variedade de tipos vegetacionais, com elevado número de espécies e também remanescentes de vegetação ainda bem preservada, que incluem um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI et al., 2004). Sua utilização inadequada está levando ao desaparecimento de algumas espécies e à consequente perda da biodiversidade (KIILL et al., 2007), uma vez que ela têm sofrido grande extrativismo dos recursos, com perdas de diversidade biológica associadas ao fornecimento de madeira e extratos vegetais (SILVA; FREIRE, 2010).

Dentre as espécies vegetais, a *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth é uma árvore nativa do nordeste brasileiro, perene e pertencente à família Mimosaceae. É uma planta arbórea que cresce naturalmente na caatinga e no cerrado, sendo popularmente conhecida como: sansão-do-campo, unha-de-gato, sabiá ou cascudo (SILVA et al., 2014; SANTOS et al., 2015). A importância da *M. caesalpiniiifolia* na região Nordeste caracteriza-se pela resistência à seca (baixa exigência em fertilidade e umidade dos solos), crescimento rápido, obtenção de madeira e como planta ornamental (ALVES et al., 2005). Na medicina tradicional, essa planta é utilizada na forma de infusões para o tratamento de feridas, bronquites, como anti-inflamatório e anti-hipertensivo (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014; SANTOS et al., 2015). Diante do potencial bioativo da planta *M. caesalpiniiifolia*, essa parte do trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo* da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth em células tumorais e em animais transplantados com o Sarcoma 180.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da planta e da amostra

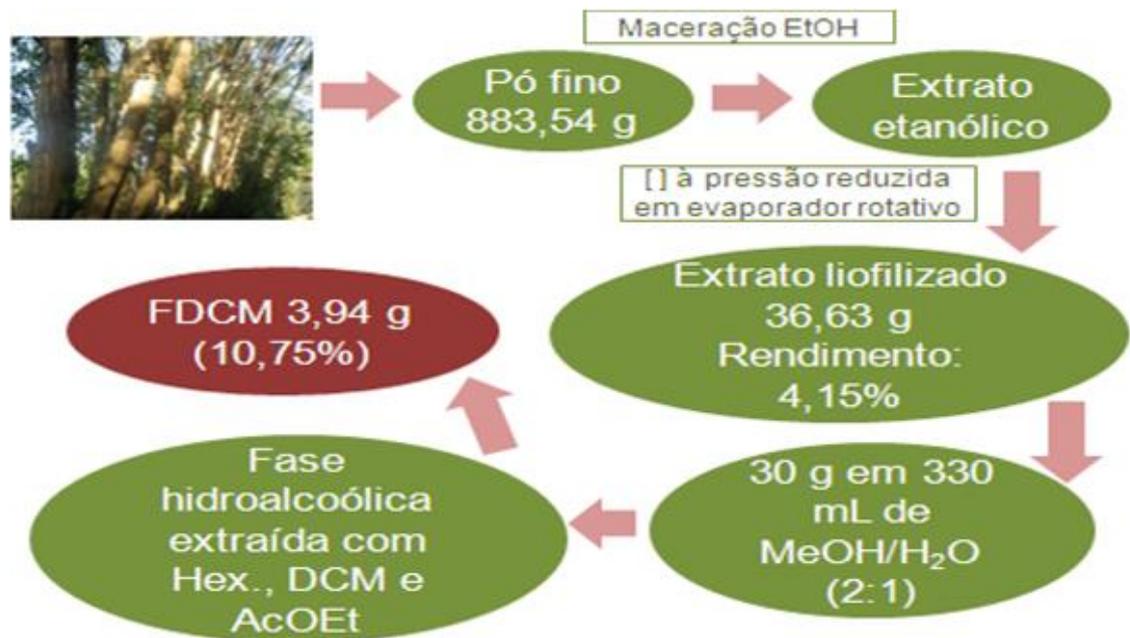
O processo típico para a descoberta de novas moléculas naturais costuma passar por etapas tradicionais desde a produção de extratos (possuindo geralmente entre 10 - 100 componentes), concentração e fracionamento até a purificação de

uma molécula. Uma alternativa eficaz para diminuir o tempo necessário para o isolamento do princípio ativo é a seleção de amostras fracionadas a partir do extrato (LAM, 2007).

A identificação da planta *Mimosa caesalpinifolia* (registro 26.824) foi baseada no uso de chaves de identificação de acordo com Brummitt; Powell (1992) e Souza; Lorenzi (2005) por botânicos do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

Para a obtenção da fração, as cascas do caule foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó fino em moinho de facas. O material obtido (883,54 g) foi macerado com álcool etílico (EtOH) na proporção 1:4 de material vegetal/solvente (m/v) com sonicação em banho de ultrassom de 30 minutos a cada dia. A fase orgânica (sobrenadante) foi submetida à filtração simples no intervalo de 3 dias e o extrato etanólico reunido foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo. Após a remoção do solvente, o extrato foi liofilizado e pesado, obtendo-se 36,63 g de extrato etanólico bruto das cascas do caule (E. EtOH) com rendimento de 4,15%. Parte do extrato (30 g) foi destinada ao processo de partição líquido-líquido. Tal processo foi realizado em funil de separação de 1 L, onde 30,0 g de E. EtOH foram suspensas em 330 mL da solução de metanol e água (MeOH/H₂O), na proporção 2:1 (v:v). A fase hidroalcoólica foi extraída com 6 x 165 mL de hexano, 7 x 165 mL de diclorometano e 12 x 165 mL de acetato de etila, respectivamente. Ao final da obtenção de cada fração, a fase orgânica reunida foi evaporada. A massa adquirida da fração diclorometano (FDCM) foi de 3,94 g (10,75%), como pode ser observada na **Figura 1**.

Figura 1 – Processo de obtenção da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* Benth.



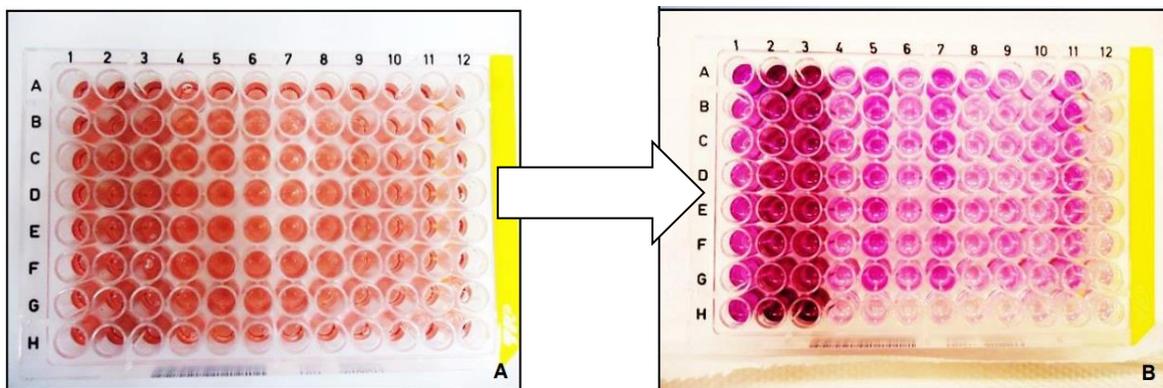
Fonte: Autoria própria (2015).

2.2 Determinação da Atividade Citotóxica *in vitro*

2.2.1 Ensaio do MTT contra linhagens tumorais

O ensaio do MTT é uma forma rápida, sensível e barata de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais (como a succinil desidrogenase) presentes somente nas células metabolicamente ativas (BERRIDGE et al., 1996). Ou seja, o sal MTT, solúvel em água e amarelo, é reduzido pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo, insolúvel em água, de forma proporcional a viabilidade das células (SKEHAN et al., 1990), como mostra a **Figura 2**.

Figura 2 – Conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.



Fonte: Adaptação de MATOS, 2013.

A FDCM foi avaliada quanto a sua capacidade citotóxica frente a 4 linhagens de células tumorais mantidas em cultura (**Tabela 1**), através do método de MTT (MOSMANN, 1983). As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade, observadas a cada 24 h em relação ao crescimento celular, com ajuda de microscópio de inversão, e, quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo.

A substância foi previamente diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) puro estéril para a concentração estoque de 5 mg/mL. Foi diluída seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,78 - 50 µg/mL). O quimioterápico doxorrubicina (0,005 - 5,0 µg/mL) foi usado como controle positivo e, como controle negativo, utilizou-se DMSO na concentração final v/v de 1,6%. Assim, as linhagens tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica), SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (carcinoma de ovário) e HCT-116 (carcinoma colorretal) foram plaqueadas nas concentrações desejadas, conforme a **Tabela 1**. Após 24 h de incubação, as substâncias foram acrescentadas às placas 96 poços (100 µL/poço). Depois de 69 h de incubação, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µL de solução de MTT 10% em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h adicionais. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o

sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspendido em 150 μ L de DMSO puro e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 1 – Linhagens celulares tumorais utilizadas na avaliação da citotoxicidade *in vitro* através do ensaio de MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
HCT-116	Carcinoma colorretal humano	$0,7 \times 10^5$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
OVCAR-8	Carcinoma de ovário humano	$0,7 \times 10^5$

Fonte: Autoria própria (2015).

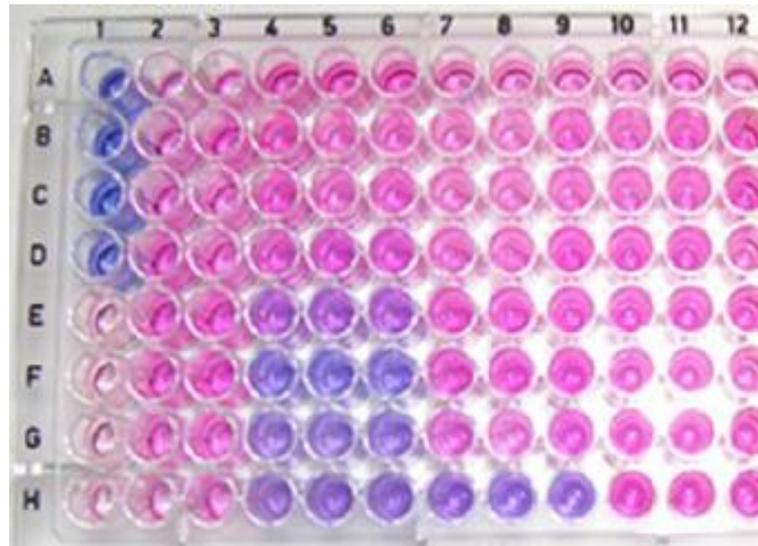
Análise dos Dados

A substância foi testada em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes (n=2). Os valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

2.2.2 Ensaio Alamar Blue® em células de Sarcoma 180

Assim como o MTT, o Alamar Blue sofre redução metabólica nas células vivas, sendo um indicador sensível da função mitocondrial, e pode ser utilizado para quantificar a viabilidade e a proliferação celular (O'BRIEN et al., 2000; RIOS, 2013) (**Figura 3**).

Figura 3 – Redução metabólica da resazurina a resorufina por células viáveis.



Fonte: Adaptação de Rios (2013).

Com o intuito de prognosticar a atividade da FDCM em modelos antitumorais *in vivo*, a fração foi avaliada também quanto a sua capacidade citotóxica frente à cultura primária de células tumorais do S180 pelo ensaio Alamar Blue. Para tanto, coletou-se, sob condições de assepsia, uma suspensão de células do tumor S180 da cavidade peritoneal de um camundongo mantido em condições padrões após 10 dias de manutenção. A suspensão foi centrifugada a 500 rpm por 5 minutos para obtenção de um *pellet*, o qual foi lavado três vezes com meio RPMI estéril. A concentração de células foi ajustada para $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Logo após o plaqueamento das células, a FDCM (0,78 – 50 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada e as placas transferidas para uma estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação, 10 μL da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (**PC**), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{PC (\%)} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

Onde:

A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = A_{OLW}/A_{OHW}$.

Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (FERREIRA et al., 2015, com algumas adaptações).

Análise dos Dados

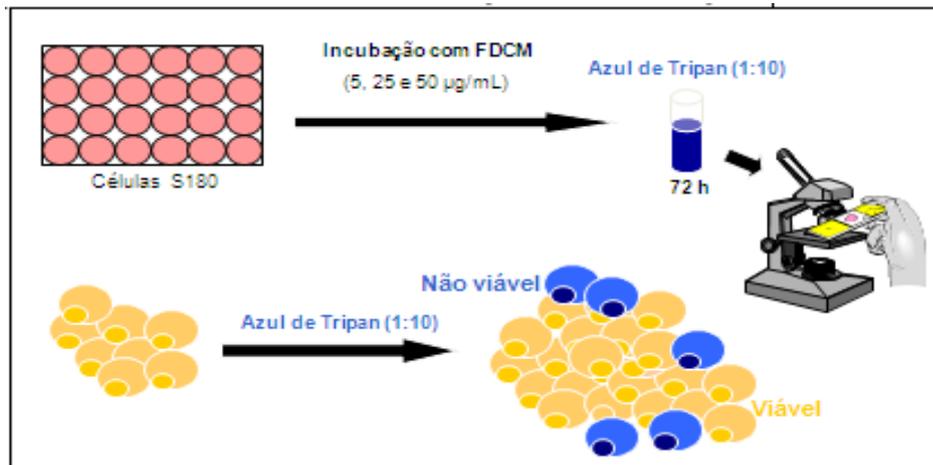
A substância foi testada em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes ($n=2$). O valor de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

2.2.3 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite verificar a viabilidade celular e quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem S180, na concentração de 172×10^4 células/mL, foram incubadas por 72 h com a FDCM. As concentrações utilizadas de FDCM (5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do Alamar Blue para esta mesma linhagem celular em um período de 72 h de incubação. Após 72 h de tratamento, 90 μL da suspensão de células foram retirados e 10 μL do azul de tripan foram adicionados. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer (**Figura 4**). A doxorubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (RENZI; VALTOLINA; FOSTER, 1993).

Figura 4 – Ilustração do teste de viabilidade celular (exclusão por azul de tripan) da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. Caesalpinifolia* em células do Sarcoma 180.



Fonte: Autoria própria (2015).

Análise dos Dados

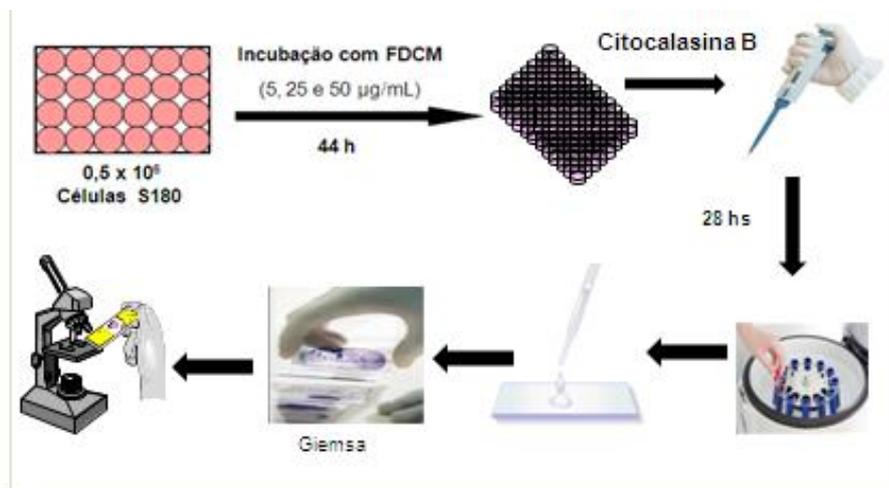
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ($n=2$) e em duplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad Prism, versão 6.0., com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.3 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) em células do Sarcoma 180

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI, suplementados com soro bovino fetal (20%), antibióticos e fitohemaglutinina A, foram adicionados 0,4 μL de suspensão celular de Sarcoma 180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Em cada frasco de cultura foram adicionados 10 μL de doxorrubicina 1 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo) ou 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da solução de FDCM (1 mg/mL). O grupo do controle negativo não recebeu tratamento. As células foram incubadas por 44 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, foram adicionados às culturas 35 μL de Citocalasina B, retornando os frascos à incubação por mais 28 h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o corpo de fundo celular foi levemente agitado, sendo centrifugados novamente após a adição de 2 mL de solução fixadora (metanol : ácido acético, na proporção 5:1) e 3

gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 3 vezes, utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Ao final, o sobrenadante foi descartado e 2 a 3 gotas da suspensão celular foram gotejados sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa (10, 25 e 50% + tampão fosfato, pH 7,4) por 5 minutos cada concentração. As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, por meio de microscópio óptico, com aumento de 1000X, considerando os danos citogenéticos presentes em 2000 células por concentração (**Figura 5**).

Figura 5 - Ilustração do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. Caesalpinifolia* em células do Sarcoma 180.



Fonte: Autoria própria (2015).

Análise dos Dados

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ($n=2$) e em duplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad Prism, versão 6.0., com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.4 Determinação da atividade antitumoral *in vivo* – Sarcoma 180

2.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* fêmeas albinas da linhagem *Swiss*, adultas com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do

Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm², com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI (Processo 034/14).

2.4.2 Protocolo de Tratamento

O modelo tumoral – tumor sólido Sarcoma 180 - foi utilizado após 10 dias de implantação na região intraperitoneal. O líquido ascítico foi retirado da cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de ringer lactato, 100 µL de gentamicina (10 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico. Foi realizada a contagem de células na câmara de Neubauer e injetadas, nos animais receptores, 2×10^6 células/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 (sete) dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 5%) e, como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg/dia). Para a FDCM, foram estabelecidas as doses de 50 e 100 mg/kg/dia, ambas administradas por via intraperitoneal (i.p.). Cada grupo era composto por 8 animais. O animal doador, ou da manutenção, foi eutanasiado por deslocamento cervical.

Os animais foram pesados antes e após o tratamento e observados durante o mesmo quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, letargia e convulsões.

No final do experimento, os animais foram sacrificados por administração de pentobarbital sódico (150 mg/Kg), via intraperitoneal, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado, estômago, coração e pulmões) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente e observações histológicas. O fluxograma de tratamento *in vivo* pode ser observado na **Figura 6**.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

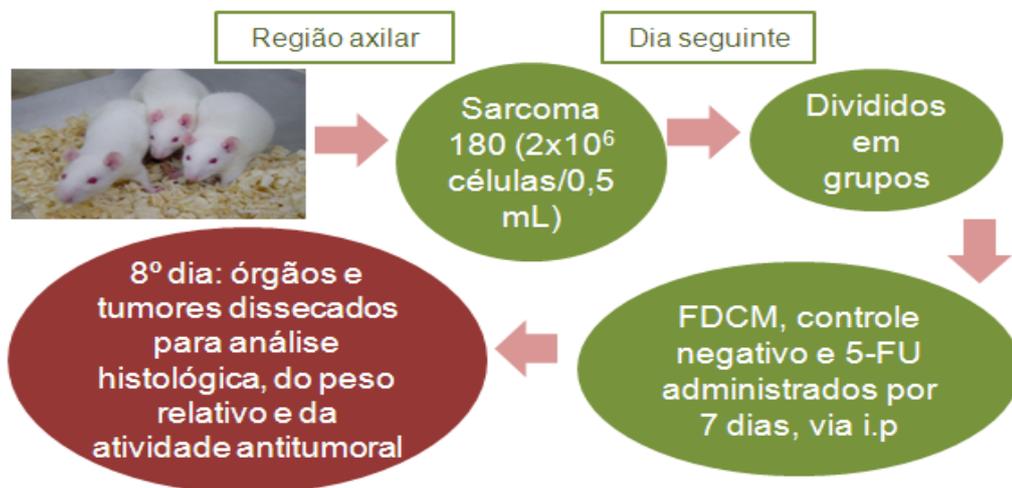
A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos Dados

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como a média \pm E.P.M. A diferença entre os grupos foi analisada por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls usando o programa GraphPad Prism®, versão 6.0 e considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Figura 6 – Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.



Fonte: Autoria própria (2015).

2.5 Observações Histopatológicas

A coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Imediatamente após dissecação e pesagem, os tumores foram armazenados em formalina tamponada 10%. Posteriormente, procedeu-se a análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70-100%), álcool e xilol, xilol e, finalmente, foram impregnados e embebidos em parafina e os fragmentos de tecido foram seccionados de 4 a 6 μm de espessura em micrótomo e preparadas as lâminas, de acordo com o protocolo de métodos histológicos de rotina. Subsequentemente, as

lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em microscópio óptico (100X e 400X).

Análise dos Dados

As lâminas contendo os tecidos tumorais dos animais tratados foram coradas e levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas com as lâminas do controle negativo. O registro das alterações foi feito por fotografia e a análise foi realizada por patologistas experientes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No último século, o desenvolvimento de agentes citotóxicos revolucionou a terapia anticâncer, pois o tratamento adjuvante com esses agentes tem demonstrado uma vantagem incontestável quando comparado ao tratamento tradicionalmente baseado na cirurgia e monoquimioterapia, tornando possível a cura de neoplasias como leucemia aguda infantil, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumores de células germinativas (SOUZA et al., 2007; ISMAEL et al., 2008). Porém, apesar destes avanços e do desenvolvimento da química combinatória, da modelagem molecular e de outras técnicas químicas de síntese usadas pelas indústrias farmacêuticas e instituições de pesquisa, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora e a mortalidade proveniente das várias formas de câncer continua inaceitavelmente alta (BUTLER, 2004). Neste cenário, as plantas têm oferecido uma oportunidade para a descoberta de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais contra diferentes tipos histológicos de câncer, estando, inclusive, vários destes compostos, além de outros já aprovados para o tratamento, em estudos de fase clínica para a avaliação e compreensão de sua eficácia terapêutica, do seu mecanismo de ação e dos efeitos adversos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005).

3.1 Citotoxicidade *in vitro*

Boa parte dos agentes utilizados na terapia antitumoral é derivada de fontes naturais e foi descoberta a partir de testes de citotoxicidade, por inibirem a proliferação de células cancerosas em modelos *in vitro* ou *in vivo* (CRAAG; NEWMAN, 2005). Portanto, sabendo da importância farmacológica e popular da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* e de que células de mamíferos em cultura são

ferramentas muito utilizadas para avaliar a citotoxicidade de novos compostos, o presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade citotóxica por MTT da FDCM em 4 linhagens de células tumorais após 72 h de incubação.

O glioblastoma conhecido como glioblastoma multiforme é o tumor maligno intracraniano mais comum, originário de células gliais, com crescimento rápido, invadindo o tecido normal de cérebro, morfológicamente diverso e prognóstico sombrio, apesar da multimodalidade terapêutica (MILLER; PERRY, 2007). Leucemia é o tipo de neoplasma mais mortal em pessoas com até 20 anos de idade. Embora muitas das atuais formas de tratamento tenham se revelado relativamente eficazes em alcançar a cura, a grande maioria dos fármacos usados no tratamento das leucemias apresentam graves efeitos colaterais. O câncer ovariano é um dos mais letais e, costumeiramente, mais mortal que o câncer cervical e endometrial juntos, não sendo uma doença de mulheres jovens ou meninas (REA, 2004). É a neoplasia ginecológica mais letal com sobrevida global inferior a 40% em cinco anos (REIS, 2005). As neoplasias do trato (TGI) constituem importante causa de mortalidade por câncer, com incidência comparável ao câncer pulmonar, e devido ao fato dos sintomas aparecerem tardiamente, geralmente são diagnosticados em estágio avançado. O câncer do cólon e reto é o terceiro mais frequente em homens e o segundo em mulheres e, embora esteja, em sua maioria, relacionado a causas genéticas, estudos mostram que até 50% dos casos podem ser prevenidos com mudanças na dieta e no estilo de vida (INCA, 2014).

O ensaio MTT mostrou que a FDCM da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* apresentou atividade citotóxica *in vitro*, com valores de CI_{50} variando entre 4,7 (linhagem de leucemia HL-60) e 7,1 $\mu\text{g/mL}$ (carcinoma de ovário OVCAR-8), conforme a **Tabela 2**. O controle doxorrubicina (DOX) foi ativo contra todas as linhagens.

Tabela 2 - Atividade citotóxica *in vitro* da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*, após 72 h de incubação, quantificada usando os ensaios de MTT (SF-295, OVCAR-8, HL-60 e HCT-116) e Alamar Blue (S-180).

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)				
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116	S-180
FDCM	5,4 (4,7–6,2)	7,1 (6,2-8,1)	4,7 (4,3-5,0)	5,2 (4,6-5,8)	29,0 (24,9-33,6)
DOX	0,2 (0,13-0,23)	0,3 (0,17-0,31)	0,02 (0,01-0,02)	0,1 (0,09-0,17)	1,9 (1,42-2,42)

FDCM: Fração diclorometano da casca do caule da planta *M. caesalpinifolia*.

Os valores (n=3) correspondem à CI₅₀ e intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não-linear para linhagens celulares tumorais humanas de glioblastoma (SF-295), carcinoma do ovário (OVCAR-8), leucemia promielocítica (HL-60) e carcinoma colorretal (HCT-116) e para o tumor murino Sarcoma 180 (S-180) obtidas da cavidade peritoneal de camundongos. O quimioterápico doxorrubicina (DOX) foi usado como fármaco padrão (controle positivo).

De acordo com o *American National Cancer Institute* (NCI), extratos e frações que apresentam valores de CI₅₀ menores que 30 µg/mL são considerados promissores para estudos posteriores de purificação de moléculas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Neste estudo, todas as amostras tiveram CI₅₀ inferiores a 30 µg/mL. Silva (2015) mostrou que a FDCM não foi capaz de causar lesões na membrana plasmática de eritrócitos de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) após 1 h de incubação até a concentração de 250 µg/mL, sugerindo que sua citotoxicidade não esteja relacionada a danos diretos à membrana plasmática (como a formação de poros ou ruptura total da membrana).

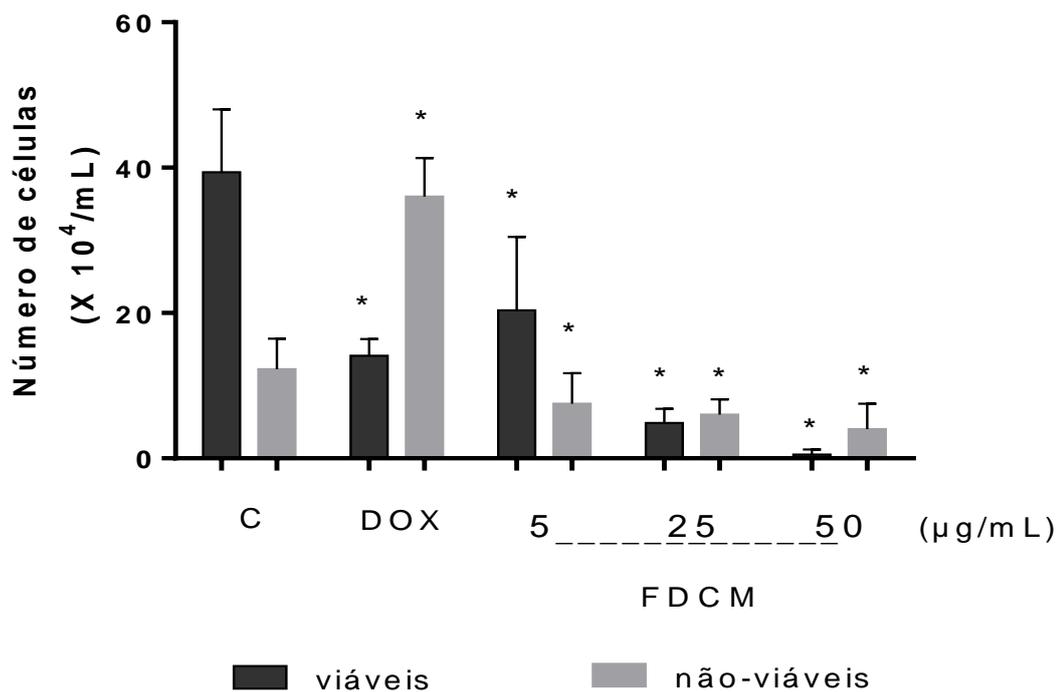
O potencial citotóxico da FDCM foi confirmado usando um modelo de cultura primária do tumor S180 e avaliado por Alamar Blue. É o teste mais simples e rápido de atividade antiproliferativa, através do qual 10% da solução, comercialmente disponível, são adicionados ao meio de células e medido quer por colorimetria ou fluorimetria. No entanto, a maior sensibilidade é conseguida usando a propriedade fluorescente. Existe uma correlação direta entre a diminuição do Alamar Blue (ou resazurina) em meio de crescimento e a quantidade / proliferação de organismos vivos, que varia a partir de bactérias até células de mamífero. Esta técnica tem sido extensivamente utilizada para avaliar diferentes tipos de células em testes de susceptibilidade toxicológicos, ambientais, antimicrobianos e citotóxicos. Ele apresenta maior sensibilidade, quando comparado com outros ensaios de

citotoxicidade, uma vez que uma menor quantidade de células e as etapas necessárias o tornam um método adequado para avaliar a proliferação em culturas primárias de células normais e de tumor de camundongos, ratos e seres humanos. (O'BRIEN et al., 2000; AL-NASIRY et al., 2007; RAMPERSAD, 2012; SCHOONEN et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

O ensaio de Alamar Blue mostrou que a fração possui atividade antiproliferativa *in vitro* contra células do S180, com valor de CI_{50} de 29 (24,9-33,6) $\mu\text{g/mL}$, após 72 h de exposição (**Tabela 2**). O controle positivo doxorrubicina foi bastante ativo.

A análise da viabilidade celular na linhagem S180 por exclusão de azul de tripan depois de 72 h de exposição (**Figura 7**) demonstrou que a FDCM causou uma significativa redução no número de células viáveis ($48,2 \pm 7,1\%$; $87,6 \pm 1,4\%$ e $98,7 \pm 0,5\%$) em todas as concentrações testadas de forma concentração dependente (5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) ($p < 0,05$). Esses resultados confirmam o potencial citotóxico da FDMC obtido por ensaios de MTT e Alamar Blue. Mostrou também uma diminuição das células não viáveis ($38,8 \pm 3,0\%$, $51,1 \pm 1,5\%$ e $67,3 \pm 2,5\%$, para as concentrações de 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Figura 7 - Efeito da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* (FDCM 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade de células tumorais do Sarcoma 180, determinado por exclusão de azul de tripan, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls.



Fonte: Autoria própria (2015).

A composição química de *M. caesalpiniiifolia* revelou a existência de triterpenos e compostos fenólicos em diferentes partes da planta (folhas, frutos, flores, galhos e cascas do caule), onde foram detectadas 32 substâncias. Os componentes de maior abundância relativa foram fitol, ácido láctico, α -tocoferol e β -sitosterol, que já haviam sido identificados na fração hexânica das folhas, frutos, ramos e cascas desta espécie e em outras espécies do gênero *Mimosa* (OHSAKI et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2012; MONÇÃO et al., 2014).

As cascas do caule de *M. caesalpiniiifolia* são caracterizadas pela ocorrência comum de polifenóis, principalmente taninos (compostos fenólicos solúveis em água) (GONÇALVES; LELIS, 2001). A importância de polifenóis e compostos relacionados em espécies de *Mimosa* estão associados com propriedades

farmacológicas e biológicas, tais como, potenciais antioxidante, citotóxico e antimicrobiano (MONÇÃO, 2015).

Em estudos prévios, o extrato etanólico das folhas de *M. caesalpinifolia* revelou potencial citotóxico máximo na concentração de 320 µg/mL em células da linhagem de carcinoma de mama (MCF-7) e induziu morte celular e alterações morfológicas sugestivas de apoptose tais com fragmentação de DNA e condensação da cromatina nuclear (SILVA et al., 2014), sugerindo que o potencial antiproliferativo dessa planta esteja relacionado à atividade quimiopreventiva em virtude da abundância de compostos fenólicos (651,9 ± 6,3 mg/g de fenóis totais e 170,1 ± 1,2 mg/g de flavonoides). Silva (2015) também demonstrou a capacidade antioxidante da FDMC por meio da identificação da inibição de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), diminuição dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da produção de nitrito (NO_2^{\cdot}) e captura do radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e do cátion radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS $^{+\cdot}$). Além disso, em estudos de análise espectrométrica por ultravioleta (UV-VIS) e por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram encontrados fortes indícios característicos de compostos fenólicos (SILVA, 2015).

Para complementar a análise da capacidade citotóxica da FDCM, realizou-se o ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN), que é um sistema abrangente para medir o dano ao DNA, citostase e citotoxicidade. O CBMN é o método preferido para medir micronúcleos (MN) em cultura de células humanas e / ou de mamíferos (SCHMID, 1975; RAMIREZ; SALDANHA, 2002; FENECH, 2007). A citocalasina B é um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel de microfilamentos, que induz a contração do citoplasma e a divisão da célula em duas células-filhas (citocinese). Essa substância leva à inibição da citocinese, mas não impede o processo de divisão nuclear. Como resultado, observa-se um acúmulo de células binucleadas (BN) a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão nuclear, e são as células que podem expressar MN. No ensaio CBMN, as células, uma vez divididas, são reconhecidas pela sua aparência, após o bloqueio da citocinese com citocalasina B. Por causa de sua confiabilidade e boa reprodutibilidade, o ensaio CBMN tornou-se um dos testes de citogenética padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

Eventos de danos ao DNA são marcados especificamente em células binucleadas (BN) e incluem (a) micronúcleos (MN), um biomarcador de quebras cromossômicas (clastogênese) e / ou perda de cromossomo inteiro (aneugênese), (b) pontes nucleoplásmicas (NPBs), um biomarcador de rearranjo cromossômico, pouca reparação e fusão de telômeros e (c) brotos nucleares (NBUDs), um biomarcador da eliminação do DNA amplificado e / ou complexos de reparação do DNA. Efeitos citostáticos são medidos através da proporção de células mono, bi e multinucleadas e a citotoxicidade através de proporções de células necróticas e / ou apoptóticas. Outras informações sobre os mecanismos que conduzem à formação de MN, NPBs e NBUDs são obtidas utilizando centrômero e / ou sondas teloméricas. O ensaio está sendo aplicado, com sucesso, para o biomonitoramento *in vivo* de agentes genotóxicos e mutagênicos, testes *in vitro* de genotoxicidade e em diversos campos de pesquisa, como a nutrigenômica e farmacogenômica (FENECH, 2007).

Micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula; se origina a partir de fragmentos do cromossomo ou cromossomos inteiros durante a divisão nuclear e não é incluído no núcleo principal. Os MN são formados durante o processo de divisão celular quando, na telófase, o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas. A detecção de MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002).

Ao longo dos últimos 17 anos, o ensaio CBMN evoluiu para um método abrangente para medir quebras cromossômicas, rearranjos de DNA, perdas cromossômicas, necrose, citostase e apoptose (FENECH, 2000). Atualmente, este método é também usado para medir NPBs, um biomarcador de cromossomos dicêntricos, resultantes da fusão dos telômeros finais ou rearranjos de DNA, e para medir NBUDs, um biomarcador de amplificação do gene (FENECH, 2006; FENECH, 2007).

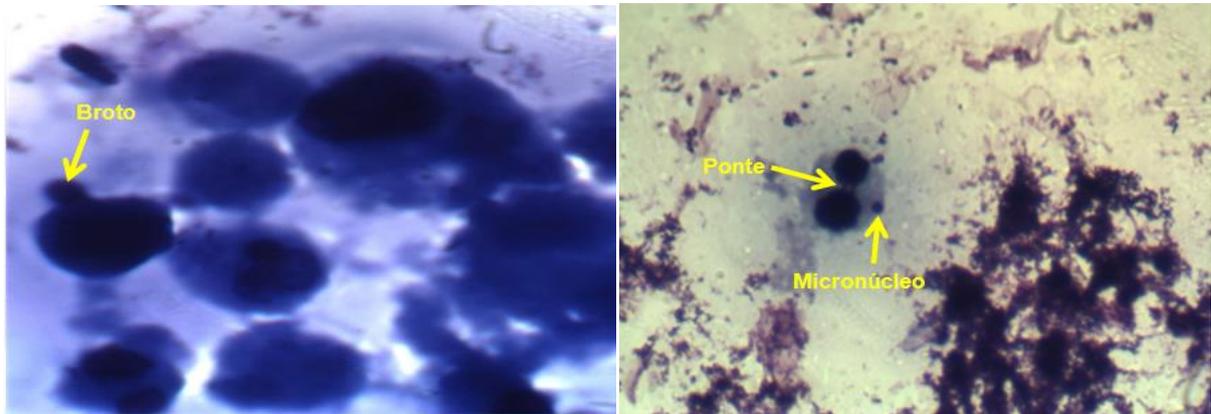
NPBs entre núcleos em células BN deve ser marcado no ensaio CBMN porque eles fornecem uma medida de rearranjo cromossômico, que não é viável de outra forma, nem em ensaio que apenas MN são pontuados (FENECH, 2000; UMEGAKI; FENECH, 2000). NPBs ocorrem quando centrômeros dos cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos da célula em anáfase. Raramente é possível observar pontes antes de a membrana nuclear ser formada, porque as células prosseguem através da anáfase e telófase rápida, completando a citocinese, a qual, em última análise, resulta no rompimento do NPB quando as células filhas se

separam. No entanto, no ensaio CBMN, células BN com NPBs são permitidas porque a citocinese é inibida e a membrana nuclear é eventualmente formada em torno dos cromossomas, permitindo uma ponte anáfase para ser observado como um NPB (FENECH, 2006).

Vários mecanismos podem levar à formação de NPB, como os rearranjos após as rupturas dos filamentos de DNA. Tipicamente, um cromossoma dicêntrico e um fragmento de cromossoma acêntrico resultam na formação de NPB um e um MN, respectivamente (THOMAS; UMEGAKI; FENECH, 2003).

Ao longo da última década, outro mecanismo único de formação de MN, conhecido como brotamento nuclear, emergiu. Este processo tem sido observado em culturas cultivadas sob fortes condições seletivas que induzem a amplificação do gene, bem como, sob a deficiência moderada de ácido fólico. A amplificação do ADN está localizada seletivamente em locais específicos na periferia do núcleo e é eliminada através de brotamento nuclear para formar MN durante a fase S da mitose. DNA amplificado pode ser eliminado através de recombinação entre regiões homólogas dentro de sequências amplificadas formando mini-círculos de DNA acêntricos e ateloméricos, que se localizam em regiões distintas dentro do núcleo, ou através da excisão das sequências amplificadas após a segregação de regiões distintas do núcleo. O processo de formação das vesículas nucleares ocorre durante a fase S e os NBUDs são caracterizados por terem a mesma morfologia, como um MN, com a ressalva de que eles são ligados ao núcleo por uma haste estreita ou larga de material nucleoplásmico, dependendo da etapa do processo de gemulação. A duração do processo de brotamento nuclear, e a extrusão da MN resultante a partir da célula permanecem em grande parte desconhecida. MN pode também ser formado por um processo de brotamento após exposição à irradiação γ (CROTT et al., 2001; KIMURA et al., 2004; SHIMIZU et al., 2005). Algumas anormalidades cromossômicas podem ser observadas na **Figura 8**.

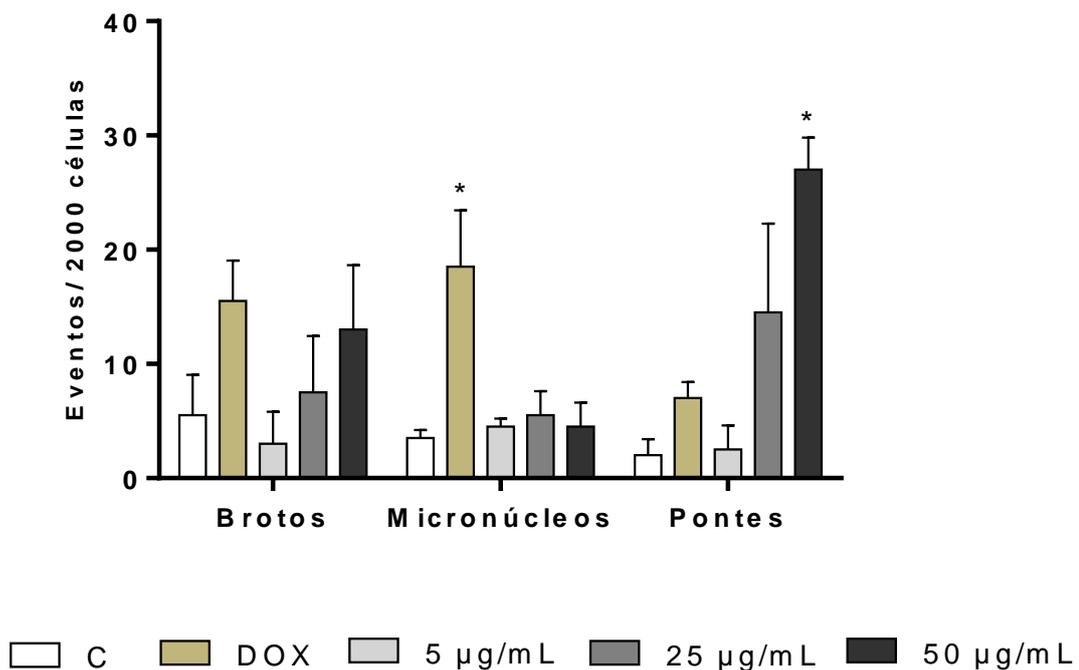
Figura 8 – Anormalidades nucleares observadas em células do Sarcoma 180, após tratamento com a fração diclorometano da casca do caule de *M. caesalpinifolia*, pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese.



Fonte: Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – Lapgenic (2015).

O ensaio do CBMN em células do S180 não mostrou potencial clastogênico e / ou aneugênico da FDCM, nas três concentrações testadas, por não induzir significativamente a formação de MN ($4,5 \pm 0,7$, $5,5 \pm 2,1$ e $4,5 \pm 2,1$, para 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) em relação ao controle negativo ($3,5 \pm 0,7$). O controle positivo (doxorrubicina $1\mu\text{g/mL}$) apresentou significativo aumento no número de MN ($18,5 \pm 4,9$) quando comparado com o controle negativo ($3,5 \pm 0,7$), o que confirma dados da literatura, que a maioria dos agentes antineoplásicos, comumente utilizados, é clastogênica ou aneugênica. O potencial antitumoral da FDCM é confirmado pelo CBMN, uma vez que induziu a formação de pontes na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$ – $27,0 \pm 2,8$) em relação ao controle negativo ($2,0 \pm 1,4$), e com dose resposta em relação a menor concentração (5 $\mu\text{g/mL}$ – $2,5 \pm 2,1$), o que é indicativo de citotoxicidade. A FDCM nas concentrações testadas e a doxorrubicina $1\mu\text{g/mL}$ não induziram a formação de brotos de forma significativa ($3,0 \pm 2,8$, $7,5 \pm 4,9$ e $13,0 \pm 5,6$, para FDCM 5, 25 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e $15,5 \pm 3,5$ para DOX $1\mu\text{g/mL}$) em relação ao grupo sem tratamento ($5,5 \pm 3,5$), o que revela não terem efeitos sobre o aumento da expressão de genes (**Figura 9**).

Figura 9 - Efeito da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* (FDCM 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) nas alterações nucleares de células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorrubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls.



Fonte: Autoria própria (2015).

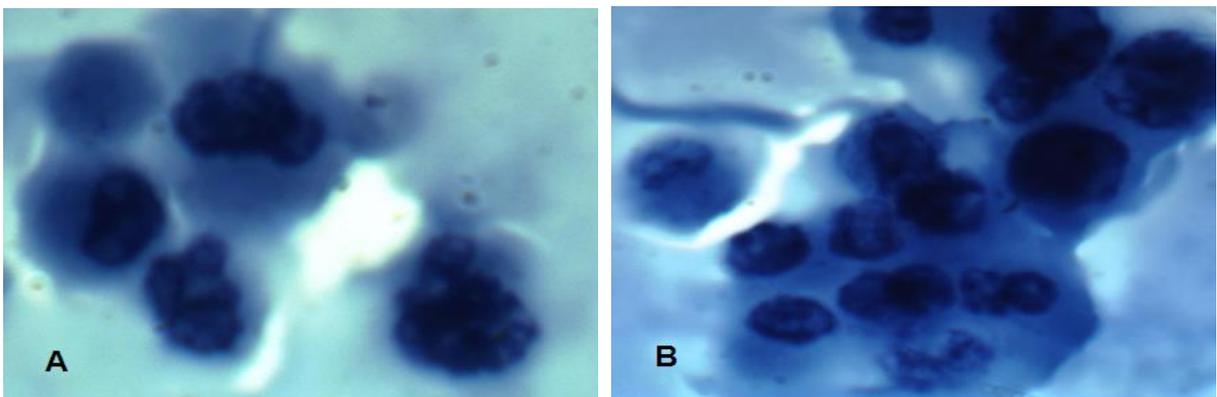
A maior parte dos agentes químicos e diferentes tipos de radiação têm múltiplos efeitos a nível celular, molecular e cromossômico, que podem ocorrer simultaneamente e em graus diferentes, dependendo da dose. Interpretação de eventos genotóxicos na ausência de dados sobre os efeitos sobre a taxa de divisão nuclear e necrose ou apoptose podem ser confundidos porque os aumentos de danos observados no genoma podem ser devidos a fatores indiretos, como a inibição da apoptose ou controle do ciclo celular com defeito levando a tempo mais curto do ciclo celular e maiores taxas de separação anômala de cromossomo. Além disso, a determinação do índice de divisão nuclear e a proporção de células em necrose e apoptose fornecem informações importantes sobre as propriedades citostáticas e citotóxicas do agente que está sendo examinado, que é relevante para

a avaliação de toxicidade (FENECH, 2000; UMEGAKI; FENECH, 2000; KIMURA et al., 2004; WU et al., 2006).

O termo apoptose, conhecido pelo jargão de morte celular programada ou suicídio celular, foi lançado na comunidade científica em 1972 (KERR, 1972). Ela ocorre normalmente em várias situações fisiológicas (embriogênese e eliminação de anticorpos auto-reativos) e patológicas (agressão aos ácidos nucléicos por radiação e drogas citotóxicas), eliminando células indesejáveis e danificadas, especialmente quando a lesão afeta o DNA. Mudanças morfológicas nas células, como a condensação e fragmentação nucleares, conseqüentemente, do próprio DNA, sugerem mecanismos de indução de morte por apoptose (KUMAR et al., 2005) (**Figura 10A**).

Em contraposição a apoptose, a necrose é, morfológicamente, caracterizada por desintegração da membrana plasmática e indução de inflamação ao redor das células mortas, atribuível à liberação do conteúdo celular e de moléculas pró-inflamatórias (**Figura 10B**). A aparência morfológica resulta da desnaturação das proteínas intracelulares, da digestão enzimática e da catástrofe bioenergética por depleção de ATP a níveis incompatíveis com a sobrevivência das células, devido a insultos tóxicos ou danos físicos (EDINGER; THOMPSON, 2004; KUMAR et al., 2005).

Figura 10 – Apoptose (A) e necrose (B) observadas em células do Sarcoma 180, após tratamento com a fração diclorometano da casca do caule de *M. caesalpiniiifolia*, pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese.

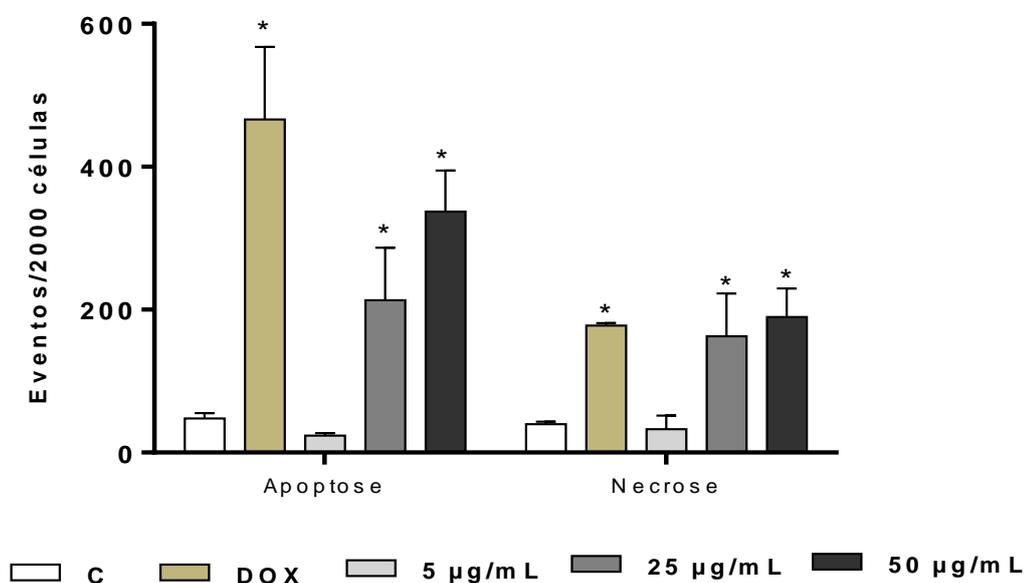


Fonte: Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – Lapgenic (2015).

A análise morfológica das células do S180, tratadas com a FDCM, pelo ensaio do CBMN, revelou que a fração tem ação antitumoral, por induzir apoptose nas duas maiores concentrações testadas ($213,0 \pm 73,5$ e $337,0 \pm 57,9$, para 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), em relação ao controle negativo ($47,5 \pm 7,7$) e com dose resposta, entre ambas e quando comparadas com a menor concentração (5 $\mu\text{g/mL}$), que não induziu apoptose ($23,5 \pm 3,5$), diante do grupo sem tratamento ($47,5 \pm 7,7$) (**Figura 11**). As células apresentaram alterações típicas de apoptose, realçadas pelo efeito antiproliferativo evidenciado na rarefação e vacuolização celulares. A doxorrubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) também apresentou apoptose significativa ($466,0 \pm 101,8$), quando comparada com o controle negativo ($47,5 \pm 7,7$) (**Figura 11**).

Quanto à indução de necrose nas células do S180, tratadas com a FDCM, pelo ensaio do CBMN, as duas maiores concentrações apresentaram aumento no número de células necróticas ($162,5 \pm 60,1$ e $189,5 \pm 40,3$, para 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), quando comparadas ao controle negativo ($39,5 \pm 3,5$) e com dose resposta em relação a menor concentração (25 $\mu\text{g/mL}$ - $32,5 \pm 19,1$). O controle positivo doxorrubicina 1 $\mu\text{g/mL}$ apresentou aumento significativo de necrose ($177,5 \pm 3,5$), quando comparou-se com o grupo sem tratamento ($39,5 \pm 3,5$) (**Figura 11**).

Figura 11 – Potencial citotóxico, por indução de apoptose e necrose, da fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* (FDCM 5, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nas células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72 h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorrubicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usado como controle positivo (DOX). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman Keuls.



Fonte: Autoria própria (2015).

É importante lembrar que compostos citotóxicos, supostamente, são capazes de matar células tumorais diretamente, as quais são fagocitadas devido à presença de antígenos que levam à reação imune (OTTER; STEERENBERG; LAAN, 2002). A necrose, embora inespecífica, possui grande valor quimioterápico já que a inflamação favorece a ativação do sistema imune contra o tumor. Logo, apesar da importância da apoptose na terapia do câncer, ela não é o único meio eficientemente capaz de matar células cancerosas (MASQUELIER et al., 2004).

A demonstração de proliferação celular em controle e em células tratadas é obrigatória para a aceitação do teste em questão, porque a expressão de MN fica comprometida quando a proporção de células em divisão é reduzida, em condições de citostase ou em meios de cultura pobres. É evidente que a melhor maneira para eliminar quaisquer possíveis efeitos de confusão de cinética de divisão celular

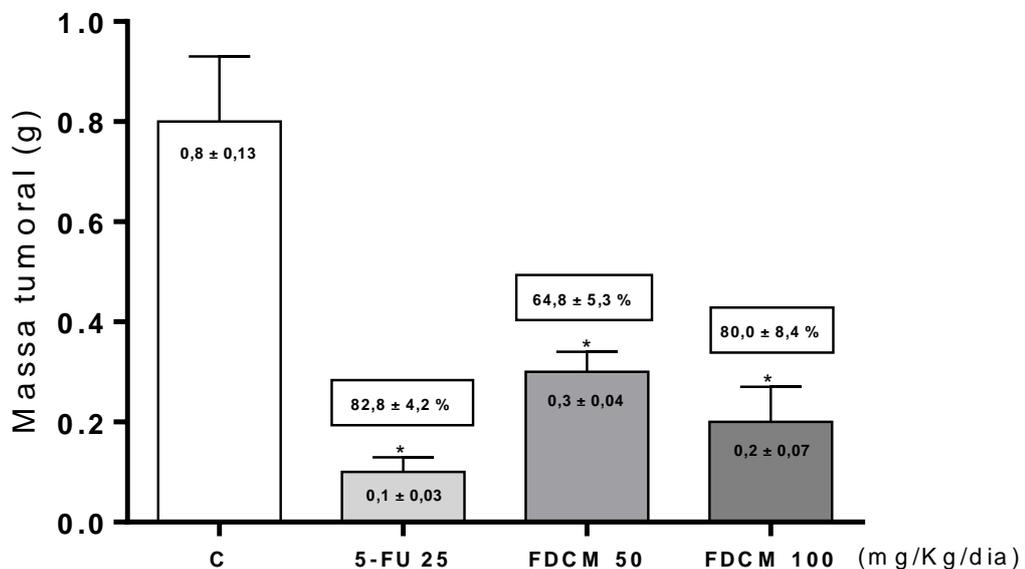
alterada é a utilização do ensaio de CBMN, independentemente do tipo de células utilizadas, marcando MN em células BN, que, além disso, permite a medição de NPBs, bem como de NBUDs, citotoxicidade e efeitos citostáticos. A escolha de não usar CBMN é justificável apenas em raras situações, em que os defeitos de citocinese estão sendo especificamente investigados (KIRSCH-VOLDERS et al., 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

3.3 Atividade antitumoral *in vivo*

Células murinas são muito exploradas como ferramentas pré-clínicas em pesquisas para novas entidades antitumorais (ZUCKERBERG, 1973; SCHABEL et al., 1977; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; OLIVEIRA, 2012;). O Sarcoma 180 é um tumor murino e uma das linhagens celulares mais usadas na pesquisa por produtos naturais com atividade antineoplásica (ITOKAWA et al., 1990; BEZERRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010; FERREIRA et al., 2011, 2015). Schabel et al. (1977) demonstrou que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral. Baseando-se nesses achados, optou-se pelo início do tratamento com a FDCM 24 h após a administração do inóculo de células cancerosas.

Os resultados da avaliação da atividade antitumoral dos camundongos transplantados experimentalmente com o tumor Sarcoma 180 e tratados com a FDCM podem ser vistos na **Figura 12**. As duas doses testadas (50 e 100 mg/kg/dia) reduziram significativamente o crescimento da massa tumoral ($0,28 \pm 0,04$ g e $0,16 \pm 0,07$ g) quando comparadas ao controle negativo ($0,81 \pm 0,13$ g). O mesmo aconteceu com o grupo do controle positivo tratado por 5-FU ($0,1 \pm 0,03$ g) ($p < 0,05$). Assim, 5-FU e as frações nas doses 50 e 100 mg/kg via i.p., revelaram, respectivamente, um percentual de inibição de crescimento do tumor de $82,8 \pm 4,2\%$, $64,8 \pm 5,3\%$ e $80,0 \pm 8,4\%$ ($p < 0,05$) (**Figura 12**).

Figura 12 - Atividade antitumoral da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* em camundongos Swiss fêmeas transplantadas com o Sarcoma 180 e tratadas, via intraperitoneal (50 e 100 mg/Kg/dia), durante 7 dias consecutivos. O controle negativo (C) recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ($n = 8$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por análise de variância (ANOVA), seguido de Student Newman Keuls.



Fonte: Autoria própria (2015).

Em relação às análises histológicas dos tumores, os tumores tratados com FDCM 50 e 100 mg/Kg/dia e 5-FU 25 mg/Kg/dia mostraram redução da quantidade e do volume celular quando comparados ao controle, embora, não tenham sido observadas diferenças entre os tumores tratados com FDCM nas concentrações de 50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia.

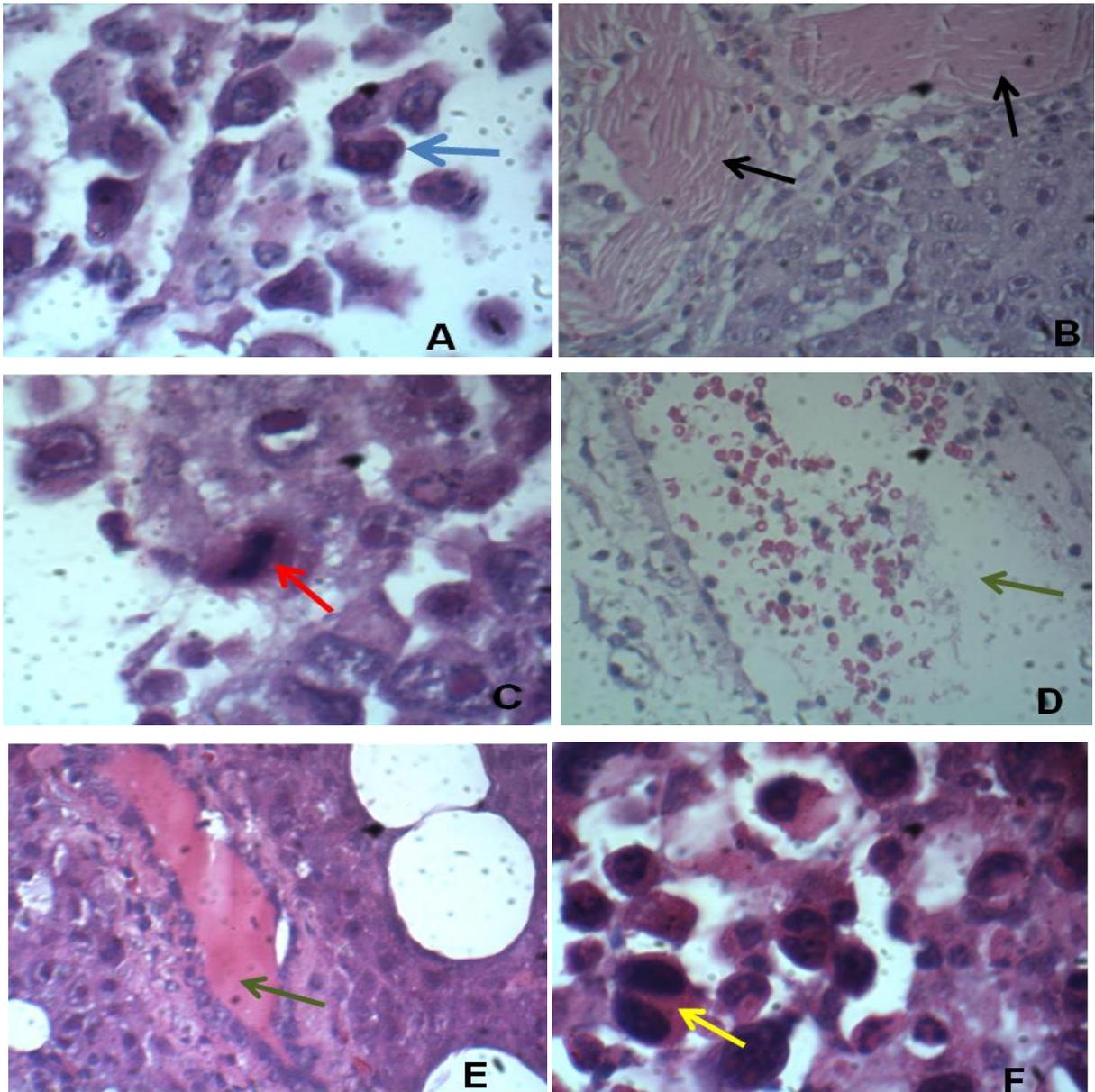
Os tumores dos animais do grupo controle negativo mostraram características de neoplasia maligna constituída por células redondas e poliédricas com anisocariose, binucleação, frequentes mitoses e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear, alterações na condensação da cromatina, além de extensas áreas de invasão muscular (**Figura 13A-13D**). As análises das massas tumorais dos grupos que receberam 5-FU (25 mg/Kg/dia) e FDCM 50 e 100 mg/kg/dia revelaram,

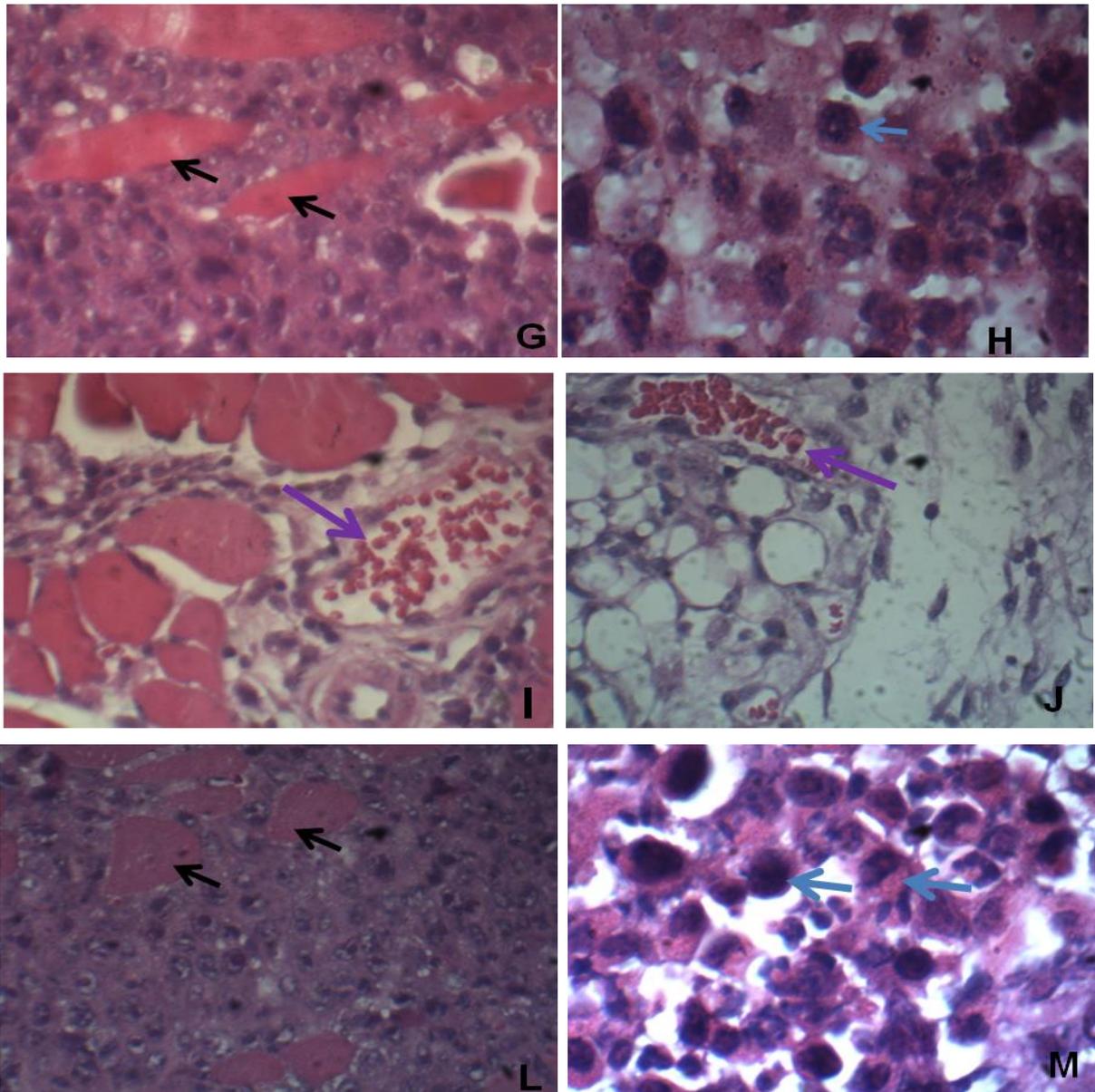
como descrito acima, morfologia típica de células neoplásicas, embora tenham sido observadas raras mitoses, sugerindo redução da proliferação (**Figura 13E-13M**).

O tumor tratado com 5-FU apresentou vasos sanguíneos de maior calibre e uma massa tumoral bastante vascularizada, semelhante ao observado no controle negativo (**Figura 13E**). Por outro lado, tais vasos não foram observados nos tumores dos grupos tratados com a FDCM nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, os quais apresentaram uma menor quantidade peri e intratumorais. A vascularização, nesse caso, estava mais restrita ao tecido adiposo que envolve externamente o tumor, podendo ser proveniente do tecido que envolve a área tumoral. Esses achados inesperados sugerem que a FDCM possa ser promissora como inibidora de angiogênese tumoral e estudos imunohistoquímicos para marcação de CD-31 estão em andamento para confirmar o potencial antiangiogênico da FDCM (**Figura 13I e 13J**).

Apesar da maioria dos tumores de S-180 desenvolver necrose a partir da 3ª semana de implante (PEREIRA; CHAVES, 1983), apenas uma semana de crescimento tumoral foi o bastante para o surgimento de necroses, como acontece nos grupos controle. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a forma sólida do S180 caracteriza-se por um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias de transplante (SCHABEL et al., 1977), sendo, portanto, a capacidade de oxigenação dos vasos sanguíneos locais e daqueles em formação (angiogênese) ultrapassada pelo aumento da massa neoplásica (PADERA et al., 2004). A necrose de coagulação que ocorre principalmente nas áreas centrais do tumor é determinada pela desnaturação da maioria das proteínas celulares (inclusive as lisossômicas) devido à queda acentuada no pH celular durante o processo de lesão por hipóxia ou isquemia. Nestes casos, o citoplasma celular se torna bastante eosinofílico e como a maioria das enzimas autolíticas foram desnaturadas, a arquitetura tecidual é mantida por alguns dias até digestão e remoção do tecido necrótico por leucócitos (KUMAR et al., 2004).

Figura 13 – Análise histológica dos tumores Sarcoma 180 de camundongos *Mus musculus* tratados com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*, via intraperitoneal (50 e 100 mg/Kg/dia), durante 7 dias consecutivos. O controle negativo (A, B, C e D) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (E e F). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, 50 mg/kg/dia (G, H e I) e 100 mg/kg/dia (J, L e M). Coloração por hematoxilina/eosina. Aumento de 400x e 1000x.





Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

- Invasão Muscular → Binucleação → Alterações na cromatina → Mitose
 → Vasos na massa tumoral → Vasos em regiões adjacentes ao tumor

Estudos fitoquímicos revelaram que o composto triterpênico ácido betulínico é o componente majoritário da FDMC (MONÇÃO, 2015), confirmando estudos anteriores que relatam a presença de terpenóides em diferentes partes da planta (MONÇÃO et al., 2014). Estudos prévios mostraram que o ácido betulínico possui atividade antitumoral seletiva *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhagens de células tumorais de carcinoma de ovário, pulmão e de cérvix uterina e melanoma (PISHA et al., 1995; ZUCO et al., 2002) e tumores cerebrais e neuroectodermis (FULDA et al., 1997; WICK et al., 1999; FULDA; DEBATIN, 2000), confirmando os resultados *in vitro* e *in vivo* encontrados no presente trabalho e sugerindo que o ácido betulínico

causa morte celular por diferentes mecanismos, incluindo a formação de espécies reativas de oxigênio (WICK et al., 1999), modulação dos níveis de proteínas antiapoptóticas (BCL-2 e BAX) (FULDA et al., 1998) e das topoisomerases I e II (ZUCO et al., 2002). A indução da morte celular está ligada diretamente a via mitocondrial, resultando na ativação de caspases e morte celular por apoptose (FULDA; DEBATIN, 2000).

Estudos *in vivo* mostraram que o ácido betulínico foi capaz de inibir o crescimento xenográfico do carcinoma de ovário humano (linhagem IGROV-1) em camundongos da linhagem CD-1 *nu/nu* na dose de 100 mg/kg/dia após 6 semanas de tratamento e administrado a cada 3-4 dias. Além disso, o ácido betulínico aumentou a sobrevivência dos animais de 16 dias no grupo controle para 22 dias no grupo teste que recebeu ácido betulínico via intraperitoneal (ZUCO et al., 2002).

4 CONCLUSÃO

A fração diclorometano da casca do caule de *Mimosa caesalpinifolia* demonstrou, pela primeira vez, potencial citotóxico *in vitro* em células tumorais humanas e murinas, capacidade antiproliferativa *in vivo* contra o tumor Sarcoma 180 e ação antiangiogênica, enfatizando as propriedades biológicas da planta e as potencialidades terapêuticas e antineoplásicas da fração.

REFERÊNCIAS

- AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v.22, n.5, p.1304-1309, 2007.
- ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, A. P.; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; DE PAULA, R. C. Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth sobre a germinação e vigor. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.29, n.6, p.877-885, 2005.
- BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.2, p.156-163, 2008.

BONASTRE, J.; CHEVALIER, J.; Laan, C. V. D.; DELIBES, M.; DE POUVOURVILLE, G. Access to innovation: Is there a difference in the use of expensive anticancer drugs between French hospitals? **Health Policy**, v.116, n.2-3, p.162-169, 2014.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, n.12, p.2141-2153, 2004.

BRUMMITT, R. F.; POWELL, C. E. **Authors of plant names**. Londres: Royal Botanic Gardens-Kew, 1992. 732p.

CHALKIDOU, K.; MARQUEZ, P.; DHILLON, P. K.; TEERAWATTANANON, Y.; ANOTHASINTAWEE, T.; GADELHA, C. A. G.; SULLIVAN, R. Evidence-informed frameworks for cost-effective cancer care and prevention in low, middle, and high-income countries. **The Lancet Oncology**, v.15, n.3, p.119-131, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.72-79, 2005.

CROTT, J. W.; MASHIYAMA, S. T.; AMES, B. N.; FENECH, M. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA *in vitro*. **Carcinogenesis**, v.22, n.7, p.1019-1025, 2001.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, n.6, p.663-669, 2004.

EIZNHAMER, D. A.; XU, Z. Q. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. **Investigational Drugs Journal**, v.7, n.4, p.359-373, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v.600, n.1-2, p.58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2, n.5, p.1084-1104, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, n.1-2, p.81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.504, n.1-2, p.131-136, 2002.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J.; DEBIASI, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA JÚNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v.72, n.1, p.43-51, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.1, p.313-330, 2015.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Betulin acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. **Medical and Pediatric Oncology**, v.35, n.6, p.616–618, 2000.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. **Neoplasia**, v.7, n.2, p.162-170, 2005.

FULDA, S.; FRIESEN, C.; LOS, M.; SCAFFIDI, C.; MIER, W.; BENEDICT, M.; NUÑEZ, G.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.; DEBATIN, K. M. Betulin acid triggers CD95 (APO-1/Fas) and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. **Cancer Research**, v.57, n.21, p.4956–4964, 1997.

FULDA, S.; SUSIN, S. A.; KROEMER, G.; DEBATIN, K. M. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuro- blastoma cells. **Cancer Research**, v.58, n.19, p.4453–4460, 1998.

GIULIETTI, A. M.; DU BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; DE QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: SILVA, J. M. C. et al (orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. MMA, UFPE, Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Embrapa Semi-Árido, Brasília, 2004, p.48-90.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.

ISMAEL, G. F. V.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, p.81-91, 2008.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA N.; MORITA, H. N.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MONTIDOME, M. New antitumor Principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n.12, p.3384-3388, 1990.

KERR, J. F. R. Apoptosis: a basic morphological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, n.4, p.239-257, 1972.

KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A; LIMA, P. C. F.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. Preservação e uso da Caatinga. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 36p.

KIMURA, M.; UMEGAKI, K.; HIGUCHI, M., THOMAS, P.; FENECH, M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **Journal of Nutrition**, v.134, n.1, p.48–56, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, n.2, p.153-163, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VON DER HUDE, W.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p.167-172, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004, 1552p.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiology**, v.15, p.279-289, 2007.

MACHADO, C. F. P.; MELO JÚNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.1, p.01-06, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MASQUELIER, M.; ZHOU, Q. F.; GRUBER, A.; VITOLS, S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. **Biochemical Pharmacology**, v.67, n.6, p.1047-1056, 2004.

MATOS, A. A. **Efeito do extrato de aroeira no processo de proliferação e mineralização de osteoblastos *in vitro***. Bauru, 2010, p. 131. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - USP.

MILLER, C.; PERRY, A. Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. **Archives of Pathology & Laboratorial Medicine**, v.131, n.1, p.397-406, 2007.

MONÇÃO, N. B. N. **Contribuição ao estudo químico e biológico das cascas do caule de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.** Teresina, 2015, p. 162. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí - UFPI.

MONÇÃO, N. B. N.; COSTA, L. M.; ARCANJO, D. D.; ARAÚJO, B. Q.; LUSTOSA, M. C.; RODRIGUES, K. A.; CARVALHO, F. A.; COSTA, A. P.; CITÓ, A. M. G. L. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpinifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, n.3, p.456–462, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NASCIMENTO, I. A.; BRAZ-FILHO, R.; DE CARVALHO, M. G.; MATHIAS, L.; FONSECA, F. A. Flavonolignoids and other compounds isolated from *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**, v.35, n.11, p.2159–2164, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1002-1037, 2003.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.17, p.5421-5426, 2000.

OHSAKI A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H.; FUKUYAMA, Y. Two diterpene rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.12, p.1728–1729, 2006.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** Fortaleza, 2012, p. 174. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

OLIVEIRA, S. M.; DA SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; DE LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**, v.31, n.3, p.614-622, 2008.

OTTER, W. D.; STEERENBERG, P. A.; LAAN, J. W. V. Testing therapeutic pontency of anticancer drugs in animal studies: a comentary. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.35, n.2, p.266-272, 2002.

PADERA, T. P.; STOLL, B. R.; TOOREDMAN, J. B.; CAPEN, D.; DI TOMASO, E.; JAIN, R. K. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. **Nature**, 427, n.6976, p.695, 2004.

PEREIRA, F. B. C.; CHAVES, F. B. Evolution of Sarcoma 180 in mice treated with hyperchlotinated water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, n.2, p.209-214, 1983.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v.1, n.1, p.1046–1051, 1995.

POPAT, K.; MCQUEEN, K.; FEELEY, T. W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.27, n.1, p. 399-408, 2013.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetics and Molecular Research**, v.1, n.3, p.246-260, 2002.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors** **12**, v12, n.9, p.12347-12360, 2012.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, p.2713-22, 2010.

REA, M. F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.5, p.142-146, 2004.

REIS, F. J. C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário – papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.4, p.222-227, 2005.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of the multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v.21, p.89-96, 1993.

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. Fortaleza, 2013, p. 122. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p.201-223.

SANTOS, M. E. P.; MOURA, L. H.; MENDES, M. B.; ARCANJO, D. D.; MONÇÃO, N. B.; ARAÚJO, B. Q.; LOPES, J. A.; SILVA-FILHO, J. C.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, R. C.; CITÓ, A. M.; OLIVEIRA, A. P. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.164, p.120–128, 2015.

SCHABEL JR, F. M.; GRISWOLD JR, D. P.; LASTER JR, W. R.; CORBETT, T. H.; LLOYD, H. H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v.1, p.411-435, 1977.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v.31, n.1, p.9-15, 1975.

SCHOONEN, W. G.; STEVENSON, J. C.; WESTERINK, W. M.; HORBACH, G. J. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpresTM and NAD(P)H production with Alamar Blue. **Toxicology in Vitro**, v.26, n.3, p.511-525, 2012.

SHIMIZU, N.; SHINGAKI, K.; KANEKO-SASAGURI, Y.; HASHIZUME, T.; KANDA, T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. **Experimental Cell Research**, v.302, n.2, p.233–243, 2005.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. Teresina, 2015, p. 166. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí – UFPI.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.2, p.267-274, 2012.

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SILVA, M. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7. **South African Journal of Botany**, v.93, p.64-9, 2014.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.427-435, 2010.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1107-1112, 1990.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v.3, p.25-41, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2005. 640p.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, n.21, p.5892–5908, 2005.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry: assays for bioactivity**. 6. ed. London: Academic Press, 1991. 376 p.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.18, n.2, p.187–194, 2003.

TRAEBERT, J.; SCHNEIDER, I. J. C.; COLUSSI, C. F.; DE LACERDA, J. T. Burden of disease due to cancer in a Southern Brazilian state. **Cancer Epidemiology**, v.37, n.6, p.788-792, 2013.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v.15, n.3, p.261–269, 2000.

WICK, W.; GRIMMEL, C.; WAGENKNECHT, B.; DICHGANS, J.; WELLER, M. Betulin acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. **Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v.289, n.3, p.1306–1312, 1999.

WU, D.; HAN, S. N.; MEYDANI, M.; MEYDANI, S. N. Effect of concomitant consumption of fish oil and vitamin E on T cell mediated function in the elderly: a randomized double-blind trial. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, n.4, p.300–306, 2006.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, n.1, p.2278-2282, 1973.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v.175, n.1, p.17-25, 2002.

CAPÍTULO III

Avaliação de parâmetros toxicológicos e fisiológicos de animais tratados com uma fração do caule de *Mimosa caesalpinifolia* Benth

(Artigo a ser submetido à Revista Toxicology and Applied Pharmacology)

Avaliação de parâmetros toxicológicos e fisiológicos de animais tratados com uma fração do caule de *Mimosa caesalpinifolia*

DRUMOND, RR¹; ALENCAR, MVOB¹, MATA, AMFO¹; MONÇÃO, NBN³, CITÓ, AMGL^{1,3}; FARIAS, DF⁴; CARVALHO, AFFU⁴; FERREIRA, PMP^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

²Departamento de Biofísica e Fisiologia, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portela, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP: 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Centro de Ciências, *Campus* do Pici, Universidade Federal do Ceará (UFC), CEP: 60440-900, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

A maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural. Compostos bioativos de fontes naturais e seus derivados também requerem informação sobre a toxicidade, já que o uso indiscriminado de plantas pode representar riscos para a saúde humana. Mesmo assim, a toxicidade dos vegetais ainda é quase sempre negligenciada. A espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* ocorre naturalmente no nordeste do Brasil e sua folhagem é considerada uma valiosa fonte de alimento para ruminantes, pois possui alto valor nutricional. As flores são melíferas e a casca tem sido usada em medicina caseira. Com isto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a toxicidade da fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. caesalpinifolia*, por meio da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano e da avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e genotóxicos em camundongos tratados por via intraperitoneal. Para avaliar a toxicidade *in vitro* da FDCM entre células normais, utilizou-se o método do Alamar Blue em PBMC humano. Parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e genotóxicos foram pesquisados em camundongos, após tratamento durante 7 dias consecutivos, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia. O valor determinado da CI₅₀ em PBMC foi de 9,1 µg/mL. A avaliação dos parâmetros bioquímicos mostrou pequena alteração na enzima aspartato aminotransferase (AST) do grupo tratado com FDCM 100 mg/Kg/dia. Este mesmo grupo apresentou aumento no número de neutrófilos e diminuição de linfócitos, e os dois grupos tratados com a FDCM mostraram uma pequena redução de eosinófilos. A genotoxicidade foi positiva, com a indução de formação de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, através do ensaio de micronúcleos, realizado em células da medula óssea. A citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano é menos seletiva do que para algumas linhagens de células tumorais, determinadas anteriormente e as alterações bioquímicas e hematológicas são insuficientes para interromper estudos promissores com a fração e seus componentes, principalmente, porque o teste histológico não mostrou alterações nos órgãos-chave envolvidos no metabolismo. E a genotoxicidade observada pode ser apenas um indício do mecanismo de ação da citotoxicidade tumoral desta fração, porém, cuidados devem ser tomados quanto ao uso da planta com fins terapêuticos.

Palavras-chave: Citotoxicidade. *Mimosa caesalpinifolia*. Parâmetros Bioquímicos. Parâmetros Hematológicos. Genotoxicidade.

Assessment of toxicological and physiological parameters of mice treated with a fraction of the *Mimosa caesalpinifolia* stem

ABSTRACT

Most of the drugs in clinical use is of natural origin. Bioactive compounds from natural sources and their derivatives also require information on the toxicity, since the widespread use of plants can pose risks to human health. Nevertheless, the toxicity of the plant is also often neglected. The plant species *Mimosa caesalpinifolia* occurs naturally in northeastern Brazil and its foliage is considered a valuable food source for ruminants, as it has high nutritional value. The flowers are honey and the bark has been used in folk medicine. With this, the objective of this work was to study the toxicity of dichloromethane fraction (MGDF) the bark *M. caesalpinifolia* plant stem, through cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and assessment of biochemical parameters, hematological, histological and genotoxic in mice treated intraperitoneally. To assess the in vitro toxicity of MGDF from normal cells, we used the method of Alamar Blue in human PBMC. Biochemical, hematological and histological genotoxic parameters were studied in mice after treatment for 7 consecutive days at doses of 50 and 100 mg/kg/day. The IC_{50} value determined in PBMC was 9.1 mg/mL. Evaluation of biochemical parameters showed little change in the enzyme aspartate aminotransferase (AST) in the group treated with MGDF 100 mg/kg/day. The same group showed an increase in the number of neutrophils and decreased lymphocyte, and the two groups treated with MGDF showed a slight reduction in eosinophils. Genotoxicity was positive, with the induction of micronucleus in polychromatic erythrocytes through the micronucleus assay, performed in bone marrow cells. The cytotoxicity of mononuclear cells of human peripheral blood is less selective than for some tumor cell lines, as determined above, and the biochemical and hematological changes are insufficient to stop promising studies with the fraction, and its components, principally because the histological test showed no changes in key organs involved in metabolism. And the genotoxicity observed may be merely an indication of the mechanism of action of tumor cytotoxicity of this fraction, however, care must be taken regarding the use of plants for therapeutic purposes.

Keywords: Citotoxicity. *Mimosa caesalpinifolia*. Biochemical Parameters. Hematological Parameters. Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Substâncias extraídas de fontes naturais são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades do ser humano há vários séculos (BRANDÃO et al., 2010). A maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Ou seja, grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, microorganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Isso mostra que a natureza ainda intacta é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos devido à grande diversidade estrutural de metabólitos primários e secundários (BRANDÃO et al., 2010).

Cerca de 80% da população mundial dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e quase 85% dessa tradição envolve o uso de plantas medicinais e seus princípios ativos (WHO, 2011). A biodiversidade brasileira é testemunha de vários casos de sucessos de bioprodutos úteis, inclusive de inovações brasileiras, representadas por descobertas e síntese de substâncias desenvolvidas pela indústria farmacêutica (BARREIRO; BOLZANI, 2009), através das modificações moleculares, que consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar a potência e segurança, garantindo, assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (WERMUTH, 2004). Mesmo assim, a toxicidade dos vegetais ainda é quase sempre negligenciada a um segundo plano e a maioria dos compostos vegetais com atividade farmacológica é relativamente pouco estudada em relação ao potencial toxicológico (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005; PING et al., 2013).

Para um reconhecimento preciso da toxicidade de plantas deve-se ter familiaridade com as plantas da região e o conhecimento das variações sazonais na concentração de substâncias tóxicas. Cada planta, assim como outras causas de doenças, produz quadros clínico-patológicos mais ou menos característicos e os achados podem comprovar a etiologia e auxiliar no diagnóstico diferencial. A cultura e o desconhecimento da população, além da quantidade ingerida pelo acidentado são fatores que dificultam o diagnóstico e o tratamento em casos de envenenamento por plantas (CHEEKE, 1998; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2002).

A espécie vegetal *Mimosa caesalpiniiifolia* ocorre naturalmente no Nordeste do Brasil. As folhas, verdes ou secas, assim como as vagens, são forrageiras. Sua

folhagem é considerada uma valiosa fonte de alimento para grandes e pequenos ruminantes, principalmente na época seca. As folhas possuem alto valor nutricional, contendo aproximadamente 17% de proteínas. As flores são melíferas e a casca tem sido usada na medicina caseira (RIBASKI et al., 2003).

No contexto da terapia antineoplásica, a determinação do potencial toxicológico e genotóxico de plantas ou de substâncias oriundas destas merece grande atenção devido ao risco de efeitos adversos que estão quase sempre relacionados a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas, o que torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, principalmente, para pacientes no estágio avançado da doença, quando os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios e o aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (KAMB, 2005; SOUZA et al., 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos e toxicológicos em animais e em células polimorfonucleares submetidos a tratamento com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da planta e da amostra

A identificação da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* (registro 26.824) foi baseada no uso de chaves de identificação de acordo com Brummitt; Powell (1992) e Souza; Lorenzi (2005) por botânicos do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

Para a obtenção da fração, as cascas do caule foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó fino em moinho de facas. O material obtido (883,54 g) foi macerado com álcool etílico (EtOH) na proporção 1:4 de material vegetal/solvente (m/v) com sonicação em banho de ultrassom de 30 minutos a cada dia. A fase orgânica (sobrenadante) foi submetida à filtração simples no intervalo de 3 dias e o extrato etanólico reunido foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo. Após a remoção do solvente, o extrato foi liofilizado e pesado, obtendo-se 36,63 g de extrato etanólico bruto das cascas do caule (E. EtOH) com rendimento de 4,15%. Parte do extrato (30 g) foi destinada ao processo de partição líquido-líquido. Tal processo foi realizado em funil de separação de 1 L, onde 30,0 g de E. EtOH foram

suspensas em 330 mL da solução de metanol e água (MeOH/H₂O), na proporção 2:1 (v:v). A fase hidroalcoólica foi extraída com: 6 x 165 mL de hexano, 7 x 165 mL de diclorometano e 12 x 165 mL de acetato de etila, respectivamente. Ao final da obtenção de cada fração, a fase orgânica reunida foi evaporada. A massa adquirida da fração diclorometano (FDCM) foi de 3,94 g (10,75%).

2.2 Determinação da Citotoxicidade *in vitro* em Cultura Primária de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano – Ensaio Alamar Blue®

Para avaliar a toxicidade das FDCM entre células normais, utilizou-se o método do Alamar Blue e células mononucleares de sangue periférico humano, que inclui linfócitos e monócitos, como modelo experimental (COSTA et al., 2008).

Sangue humano heparinizado (obtido de voluntários saudáveis, não-fumantes, que não fizeram uso de qualquer droga por pelo menos 15 dias antes da coleta, com idade entre 18-35 anos) foi coletado e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo método padrão de centrifugação de gradiente de densidade por Ficoll Paque®. Todos os estudos foram realizados em conformidade com as diretrizes de pesquisa brasileiras (Lei 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde) e com a Declaração de Helsinki.

PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de 20 mL de sangue periférico acrescida de 5 mL de PBS estéril. Essa mistura foi adicionada a um tubo falcon com 2 mL de Ficoll (Ficoll Paque® Plus) e submetida à centrifugação (2000 rpm por 30 min) (**Figura 1**). Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro chamada de nuvem de linfócitos foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo. Posteriormente, completou-se com PBS até o volume de 11 mL e centrifugou-se o tubo a 1000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em 2 mL de PBS. As células foram colocadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina/estreptomicina para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (4%) foi adicionada para induzir a proliferação celular. As células foram incubadas 24 h antes da adição da amostra. A FDCM foi adicionada (0,78 – 50 µg/mL) e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. O quimioterápico doxorubicina (0,005 - 5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação de 72 h, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a

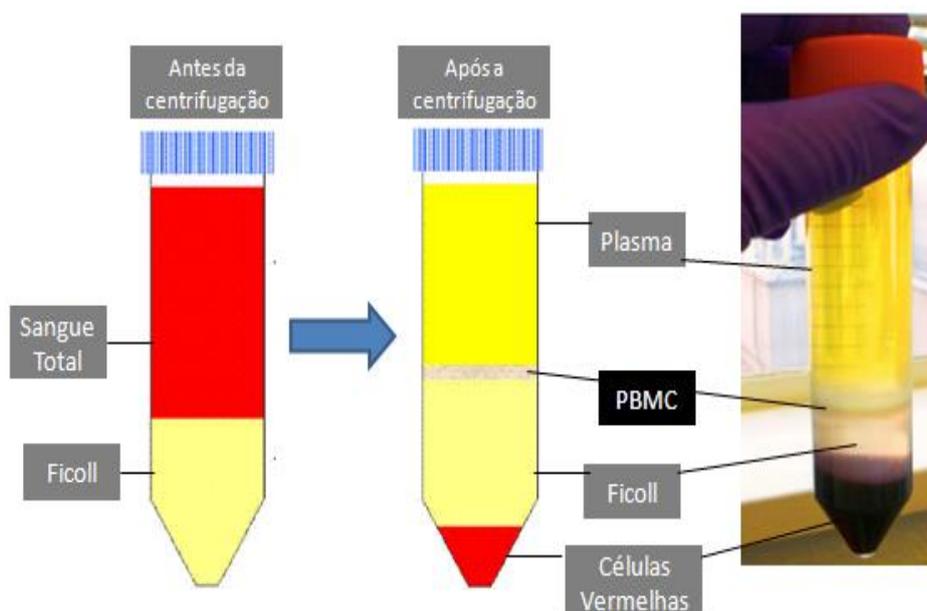
570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (**PC**), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

Onde:

A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (COSTA et al., 2008, com algumas adaptações).

Figura 1 – Isolamento de PBMC por meio da tecnologia de Ficoll Paque® Plus.



Fonte: Adaptação de Genetic Resources Core Facility (2015).

Análise dos Dados

A fração foi testada em diluição seriada, em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes ($n=2$). O valor de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

2.3 Peso dos órgãos, análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, observações histopatológicas e determinação de danos cromossômicos

2.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* fêmeas albinas da linhagem *Swiss*, adultas com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm², com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI (Processo 034/14).

2.3.2 Protocolo de tratamento e análise de parâmetros fisiológicos

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n= 8/grupo). Como controle negativo, utilizou-se o veículo de diluição da amostra (dimetilsulfóxido 5%). O controle positivo recebeu o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia). Para a FDCM, foram estabelecidas as doses de 50 e 100 mg/kg/dia, ambas administradas por via intraperitoneal (i.p.) com base em estudos prévios baseados na OECD 423. O tratamento foi realizado durante 7 (sete) dias consecutivos.

Os animais foram pesados antes e após o tratamento e observados durante o mesmo quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, letargia e convulsões. Antes da coleta de sangue os animais foram submetidos a um jejum de 10 h. Para a coleta, eles foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) e a coleta foi realizada por punção cardíaca ventricular com seringas estéreis. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante, para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados por administração de pentobarbital sódico (150 mg/kg), via intraperitoneal e os órgãos (fígado, baço, rins, estômago, coração e pulmões) foram dissecados para a análise macroscópica, do peso relativo dos mesmos e das observações histopatológicas.

Para a análise bioquímica de funções orgânicas, o material foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros renais e hepáticos: colesterol total, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL). Os ensaios foram realizados em aparelho semi-automático Labmax 240 com sistemas comerciais da Labtest® e seguindo as orientações do fabricante.

Os valores de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões de lâminas coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada lâmina, 100 células foram analisadas e contadas.

2.3.3 Observações Histopatológicas

A coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Imediatamente após a pesagem, os órgãos (fígado, baço, rins, estômago, coração e pulmões) foram armazenados em formalina tamponada 10%. Posteriormente, procedeu-se a análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70-100%), álcool e xilol, xilol e, finalmente, foram impregnados e embebidos em parafina e os fragmentos de tecido foram seccionados de 4 a 6 µm de espessura em micrótomo e preparadas as lâminas, de acordo com o protocolo de métodos histológicos de rotina. Subsequentemente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em microscópio óptico (100X e 400X).

Análise dos Dados

As lâminas contendo os tecidos dos órgãos dos animais tratados foram coradas e levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas com as lâminas do controle negativo. O registro das

alterações foi feito por fotografia e a análise foi realizada por patologistas experientes.

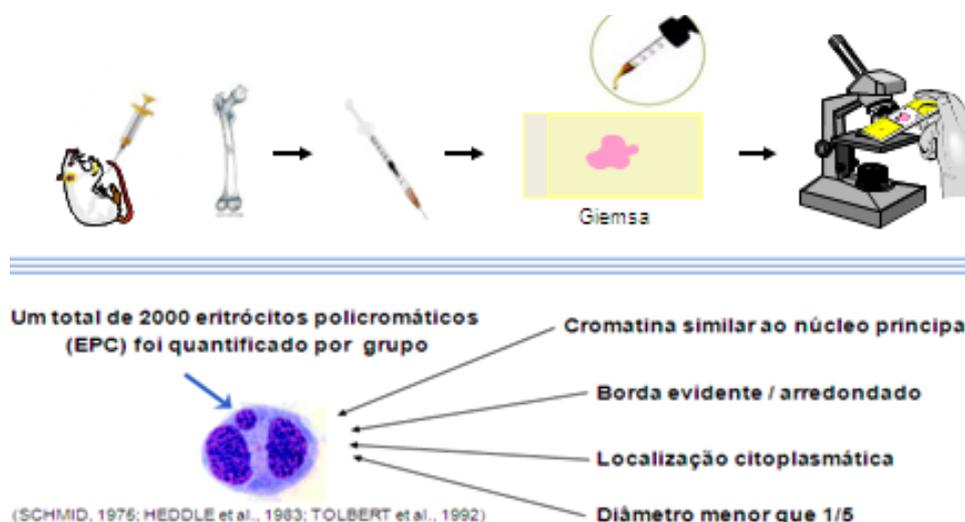
2.3.4 Determinação de Alterações Nucleares – Teste do Micronúcleo (MN)

A detecção de atividade genotóxica e/ou mutagênica constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos e modificar a informação genética contida no DNA (BENIGNI, 2005).

Todos os animais tratados (DMSO 5%, 5-FU 25 mg/Kg/dia, FDCM 50 e 100 mg/Kg/dia) foram sacrificados com tiopental (150 mg/Kg) 24 h após o término do tratamento, imediatamente após a coleta de sangue por punção cardíaca. Os fêmures foram retirados, limpos e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringas de 1 mL previamente preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula diretamente sobre a lâmina e, em seguida, foi realizado o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas por cada animal. Vinte e quatro horas após a confecção das lâminas, o material foi fixado e corado com solução de Giemsa (10, 25 e 50% + tampão fosfato, pH 7,4) por 5 min cada concentração (SCHMID, 1975) (**Figura 2**).

Toda a análise foi realizada em teste cego, utilizando microscópio óptico binocular, com objetiva de imersão (**Figura 2**). Foram considerados micronúcleos (MN) as estruturas tipicamente arredondadas, com diâmetro de 1/5 a 1/20 do diâmetro dos eritrócitos jovens identificados pela coloração azulada (SCHMID, 1975; HEDDLE et al., 1983). Um total de 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) foi quantificado por lâmina (HEDDLE et al., 1983).

Figura 2 - Ilustração do teste de micronúcleo (MN) realizado em células da medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas adultas tratadas, por via intraperitoneal, durante 7 dias consecutivos, com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *M. Caesalpinifolia*.



Fonte: Autoria própria (2015).

Análise dos Dados

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes e em duplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey, usando o programa GraphPad Prism, versão 6.0., com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos não inclui apenas o perfil farmacocinético e farmacodinâmico, mas também fases essenciais da avaliação da segurança farmacológica e da janela terapêutica, incluindo a toxicologia sistêmica e genética (WERMUTH, 2004; BASS et al., 2009). Os resultados destes estudos permitem a exclusão do candidato a um novo medicamento antes do dispêndio de tempo e de recursos materiais e humanos (BASS et al., 2009; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

Para que uma planta apontada como responsável pela intoxicação venha a ser classificada como espécie tóxica, sua toxicidade deve ser comprovada experimentalmente. Esta reprodução experimental deve ser realizada na mesma

espécie animal, naturalmente afetada, ou mais próxima a ela, no caso da toxicidade em seres humanos, uma vez que há muitas diferenças na susceptibilidade aos efeitos das plantas tóxicas entre as espécies (CHEEKE, 1998; TOKARNIA; DEBEREINER; PEIXOTO, 2002; WILLIAMS et al., 2002). Nos experimentos de avaliação toxicológica da FDCM, foram usados camundongos *Mus musculus*, uma espécie muito aplicada em estudos de toxicidade pré-clínica para a validação do uso tradicional de substâncias provenientes de plantas medicinais (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009, 2015).

3.1 Citotoxicidade *in vitro* em PBMC

A avaliação do potencial citotóxico de uma substância em células normais é de fundamental importância para determinar a seletividade do composto (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003; FERREIRA et al., 2015). Uma vez que a FDMC apresentou citotoxicidade contra linhagens tumorais, decidiu-se, então, avaliar seu efeito citotóxico também contra PBMC em cultura primária após 72 h de incubação usando o ensaio de Alamar Blue. Semelhante aos resultados obtidos para as linhagens cancerosas, a fração revelou ser citotóxica contra PBMC, com um valor de CI_{50} de 9,1 (8,1-10,1) $\mu\text{g/mL}$, revelando uma citotoxicidade cerca de 2 vezes maior para células leucêmicas da linhagem HL-60 (CI_{50} de 4,7 $\mu\text{g/mL}$).

Estudos recentes com o extrato etanólico das folhas, com a fração hexânica da casca e com a fração diclorometano da casca do caule da planta *Mimosa caesalpiniiifolia* revelaram toxicidade em náuplios de *Artemia salina* (CL_{50} de 1765 mg/L, 885,1 $\mu\text{g/mL}$ e 278,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e o extrato etanólico das folhas mostrou citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (CI_{50} de 706,5 $\mu\text{g/mL}$) (MONÇÃO et al., 2014; SILVA, 2015). Monção et al. (2014) relatou a presença de compostos triterpênicos nas cascas de *M. caesalpiniiifolia*, sendo o ácido betulínico o principal representante da FDMC (MONÇÃO, 2015; SILVA, 2015). O ácido betulínico é conhecido por sua capacidade antiproliferativa *in vitro* contra células tumorais (PISHA et al., 1995; FULDA et al., 1997; WICK et al., 1999; FULDA; DEBATIN, 2000; ZUCO et al., 2002), possuindo também citotoxicidade em células normais de fibroblasto da derme ($10.2 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, e, ao contrário do encontrado no presente estudo, o ácido betulínico isolado é inativo contra PBMC humano após 72 h de incubação (ZUCO et al., 2002). Um fator que pode explicar essa diferença de potencial citotóxico entre a FDMC e o ácido betulínico isolado pode estar relacionado aos inúmeros constituintes presentes em frações vegetais,

os quais apresentar efeitos sinérgicos devido à presença de diferentes princípios ativos contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985).

3.2 Parâmetros Bioquímicos

No geral, o principal objetivo dos estudos de toxicidade é identificar a presença do composto responsável pelos danos, as alterações específicas relacionadas a ele e correlacioná-las com estudos histopatológicos, hematológicos e com o perfil bioquímico sérico (CULLEN; MILLER, 2006; RAMAIAH, 2007). Portanto, alguns produtos medicinais naturais têm efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (LIN et al., 2003; AKDOGAN et al., 2003). Danos à integridade estrutural desses órgãos frequentemente resultam em elevações nos parâmetros químicos, tais como as enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, uréia e creatinina (KALLNER, TRYDING, 1989; AKDOGAN et al., 2003).

A análise do perfil bioquímico sérico revelou, de forma geral, que a FDMC não induziu modificações significantes quando comparado com o grupo controle negativo ($p > 0,05$), com exceção do aumento dos níveis de AST na dose de 100 mg/kg/dia da FDMC ($315,3 \pm 8,9$ U/mL) ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). De fato, danos hepáticos sempre causam elevação dessas enzimas no soro, já que o fígado é o principal órgão detoxificador e metabolizador do corpo, estando exposto a uma enorme variedade de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais (SHAHJAHAN et al., 2004; LIEBLER; GUENGERICH, 2005). Por outro lado, a enzima AST é menos específica para danos no fígado do que a ALT. Além disso, a AST está envolvida em danos teciduais inespecíficos, sendo encontrada em diferentes tipos de tecidos, pois, apesar dessa enzima ocorrer no fígado, ela é mais abundante no coração, nos músculos esqueléticos e eritrócitos (SACHER; McPHERSON, 2000). Outra causa para a elevação da AST seria decorrente dos danos e/ou traumas musculares após injeções intramusculares repetidas por vários dias (como estabelecido no protocolo experimental), pois esse procedimento pode resultar na elevação de ambas as aminotransferases, porém, a AST aumenta com maior frequência (RAMAIAH, 2007).

Os resultados aqui descritos coincidem com estudos *in vivo* prévios recentes de MONÇÃO et al. (2014), os quais indicaram baixa toxicidade e ausência de alterações bioquímicas hepáticas e renais nos níveis de FAL, AST, uréia e creatinina em camundongos *Swiss* tratados com o extrato etanólico das folhas de *M. Caesalpinifolia* via oral na dose de 750 mg/kg/dia. É provável que essa baixa toxicidade esteja relacionada com a presença de compostos antioxidantes presentes

na planta (MONÇAO et al., 2014; SILVA, 2015; SANTOS FILHO; FERREIRA; GOUVÊA, 2011).

Tabela 1 – Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos adultos *Swiss* fêmeas tratadas com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia* durante 7 dias consecutivos nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo.

Grupos	Controle Negativo	5-FU 25 mg/Kg/dia	FDCM 50 mg/Kg/dia	FDCM 100 mg/Kg/dia
Parâmetros				
AST (U/mL)	286,9±5,8	303,2±7,6	280,8±9,1	315,3±8,9*
ALT (U/mL)	158,8±2,6	157,5±4,3	161,6±5,0	156,3±1,1
FAL (U/L)	112,3±5,5	131,2±9,8	101,2±3,4	93,8±6,6
Creatinina (mg/dL)	0,5±0,05	0,5±0,08	0,4±0,01	0,4±0,04
Uréia (mg/dL)	48,9±4,2	37,7±2,4	41,3±6,6	42,8±3,1
CT (mg/dL)	140,4±4,4	137,7±1,8	145,0±3,0	160,0±1,0

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 8 animais/grupo).

* p < 0,05 comparado ao controle (DMSO 5%) e analisado por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls. AST: Aspartato Aminotransferase, também conhecida como TGO, transaminase glutâmico-oxalacética; ALT: Alanina Aminotransferase, também conhecida como TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; FAL: Fosfatase Alcalina; CT: Colesterol Total.

3.3 Parâmetros Hematológicos

O sangue é um parâmetro importante da condição fisiológica e patológica em seres humanos e animais e os parâmetros medidos são geralmente as contagens totais de glóbulos vermelhos e seus índices, hemoglobina, hematócrito, o total de contagem de células brancas do sangue e suas contagens diferenciais, contagem de plaquetas, além dos parâmetros bioquímicos. O intervalo normal destes parâmetros pode ser alterado pela ingestão de algumas plantas tóxicas (ADENEYE et al., 2010).

Em relação aos parâmetros hematológicos, os animais tratados por via intraperitoneal com a FDCM na dose de 50 e 100 mg/kg/dia mostraram redução do número de eosinófilos (0,7 ± 0,3 e 0,4 ± 0,2%) quando comparados ao controle negativo (1,8 ± 0,4%), embora neutrofilia (33,8 ± 3,2%) e leucopenia (61,5 ± 3,6%)

tenham sido observadas apenas na maior dose em comparação ao controle negativo ($18,8 \pm 2,8$ e $77,3 \pm 3,0\%$), respectivamente ($p < 0,05$).

O quimioterápico 5-FU na dose de 25 mg/Kg/dia causou redução considerável e já esperada no número de leucócitos totais ($1,6 \pm 0,3\%$), acompanhada por diminuição do número de neutrófilos ($12,9 \pm 1,3\%$), monócitos ($0,6 \pm 0,2\%$) e eosinófilos ($0,6 \pm 0,3\%$) ($p < 0,05$) (**Tabela 2**). Semelhante ao encontrado no presente trabalho, vários fármacos, com efeito antitumoral, causam supressão hematológica e imunológica, como observado com o docetaxel (RINGEL; HORWITZ, 1991), metotrexato (KATZUNG et al., 2003) e o 5-FU (BEZERRA et al., 2008). A redução dos leucócitos pode ser devido à insuficiência na taxa de entrada dessas células no sangue a partir da medula óssea e/ou uma retirada da circulação periférica (AFOLAYAN; YAKUBU, 2009).

Tabela 2 – Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos *Swiss* fêmeas adultas tratadas via intraperitoneal com a fração diclorometano (FDCM) da casca do caule da planta *Mimosa caesalpinifolia*, durante 7 dias consecutivos, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo.

Grupos	Controle Negativo	5-FU 25 mg/Kg/dia	FDCM 50 mg/Kg/dia	FDCM 100 mg/Kg/dia
Parâmetros				
Hemácias (mm ³)	4,5±0,2	4,4±0,2	5,0±0,1	4,9±0,2
Hemoglobina (g/dL)	13,6±0,7	13,3±0,8	15,4±0,4	15,0±0,7
Hematócrito (%)	40,7±2,3	40,1±2,3	46,3±1,1	44,9±2,2
VCM (fL)	90,8±0,5	90,6±0,6	91,8±0,3	91,6±0,5
HCM (pg)	30,2±0,2	30,2±0,2	30,5±0,1	30,5±0,2
CHCM (g/dL)	33,3±0,1	33,1±0,1	33,2±0,1	33,3±0,1
Plaquetas (mm ³)	3,6±0,5	2,9±0,2	3,4±0,2	3,4±0,2
Leucócitos Totais (mm ³)	5,1±0,4	1,6±0,3*	5,4±0,6	4,9±0,7
Neutrófilos (%)	18,8±2,8	12,9±1,3*	23,3±4,1	33,8±3,2*
Bastonetes (%)	0,4±0,2	0,4±0,3	0,6±0,2	1,8±0,7
Linfócitos (%)	77,3±3,0	85,6±1,8	73,7±4,1	61,5±3,6*
Monócitos (%)	1,8±0,3	0,6±0,2*	1,7±0,6	2,6±0,8
Eosinófilos (%)	1,8±0,4	0,6±0,3*	0,7±0,3*	0,4±0,2*
Basófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 8 animais/grupo).

* p < 0,05 comparado ao controle (DMSO 5%) e analisado por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls. VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

3.4 Ganho ponderal e peso relativo dos órgãos

Além da avaliação de alterações hematológicas e bioquímicas, a toxicidade sistêmica pode se manifestar através das alterações de comportamento, como apatia, perda de peso, diarreia, contorções abdominais e redução no consumo de água e ração e do peso relativo dos órgãos, uma vez que está bem estabelecido que o consumo de substâncias que contenham componentes tóxicos pode refletir em alterações no peso relativo dos diferentes órgãos através do aumento ou involução

dos mesmos (BARDOCZ et al., 1996; FERREIRA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010).

Após a dissecação dos animais, a análise do peso relativo úmido de seis órgãos (fígado, rins, baço, estômago, coração e pulmões) não revelou alterações no estômago, coração e pulmões dos animais tratados quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$) (**Tabela 3**), mas ocorreu redução significativa do baço no grupo tratado com 5-FU ($0,2 \pm 0,04$ g/100g de peso corpóreo) e em ambas as doses de FDMC (50 e 1000 mg/kg/dia, $0,2 \pm 0,08$ e $0,2 \pm 0,03$ g, respectivamente), aumento do rins na maior dose da FDMC ($1,3 \pm 0,05$ g) e diminuição do fígado nos animais do controle positivo ($4,7 \pm 0,1$ g) quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$).

A perda de peso é um dos efeitos colaterais mais comuns após algumas sessões de quimioterapia, uma vez que as células da mucosa intestinal também são alvos inespecíficos do fármaco antineoplásico, favorecendo o surgimento de vômito e diarreia e interferindo diretamente na digestão e absorção dos alimentos (KATZUNG et al., 2003). Essa perda ficou evidente tanto no controle positivo com 5-FU ($20,1 \pm 0,9$ g) quanto nas doses da FDMC de 50 mg/kg/dia ($20,6 \pm 0,8$ g) e de 100 mg/kg/dia ($21,4 \pm 1,6$ g) ($p < 0,05$).

Investigações prévias mostraram que a dose de 750 mg/kg/dia do extrato etanólico das folhas de *M. Caesalpinifolia* aplicada durante 30 dias consecutivos via oral por gavagem também causou perda de peso, além de induzir hepatomegalia e aumento do peso relativo das glândulas adrenais e da hipófise (MONÇÃO et al., 2014).

Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss fêmeas tratadas, via intraperitoneal, com a fração diclorometano da casca do caule de *Mimosa caesalpiniiifolia* (FDCM 50 e 100 mg/Kg/dia), durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo.

Tratamento	Dose (mg/Kg/dia)	Peso Final (g)	Fígado	Rins	Baço	Coração	Estômago	Pulmão
			Peso Relativo (g/100 g de peso corpóreo)					
Controle Negativo	-	26,3 ± 2,2	6,0 ± 0,4	1,1 ± 0,05	0,4±0,04	0,4 ± 0,01	1,0 ± 0,07	0,8 ± 0,09
5-FU	25	20,1 ± 0,9*	4,7 ± 0,1*	1,2 ± 0,06	0,2±0,04*	0,5 ± 0,03	1,1 ± 0,06	0,8 ± 0,06
FDCM	50	20,6 ± 0,8*	5,8 ± 0,2	1,2 ± 0,05	0,2±0,08*	0,5 ± 0,03	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,20
	100	21,4 ± 1,6*	5,9 ± 0,2	1,3 ± 0,05*	0,2±0,03*	0,5 ± 0,03	1,2 ± 0,5	0,8 ± 0,04

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 8 animais/grupo).

* p < 0,05 comparado ao controle (DMSO 5%) e analisado por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

3.5 Análise histopatológica dos órgãos

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (DMSO 5%) e dos grupos tratados com a FDCM (50 e 100 mg/Kg/dia) não apresentaram sinais de toxicidade e observou-se semelhança nos órgãos dos três grupos. O fígado apresentou-se sem alterações, ou seja, o tecido apresentou-se íntegro, e ausente de hiperplasia, pigmentos de hemossiderina, de leucócitos, de tumefação celular, de congestão portal e de áreas de necrose (**Figura 3A, B, E, F, G e H**). Os rins também se apresentaram normais, sem tumefação celular, degeneração tubular, congestão vascular ou foco de necrose (**Figura 4A, B, E, F, G e H**). O baço não apresentou mudanças visíveis, com organização dos folículos linfóides, parênquima normal e ausência de nódulos linfáticos, pigmentos de hemossiderina ou megacariócitos (**Figura 5A, C e D**). No coração, não foram observadas áreas de degeneração e nem proliferação de fibroblastos e as estriações do músculo cardíaco estavam bem visíveis (**Figura 6 A, C e D**). Os pulmões apresentaram bronquíolos e espaços alveolares visíveis, ausência de células mono e polimorfonucleares e de áreas de necrose (**Figura 7A, C e D**). O estômago demonstrou ausência de estrias hemorrágicas, região da cárdia com revestimento escamoso queratinizado, sem alterações no córion e visualização de células parietais e principais, com mucosa e submucosa normais (**Figura 8A, C e D**).

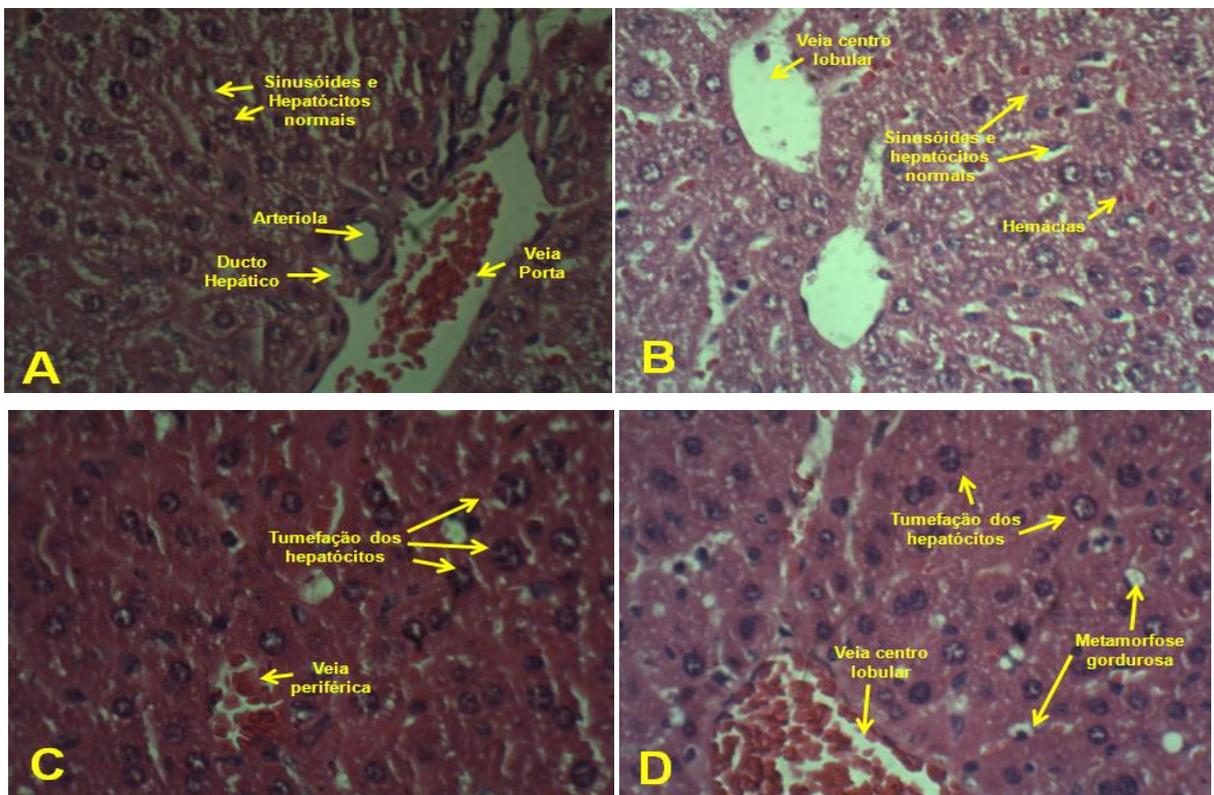
Quanto ao grupo tratado com o 5-FU (25 mg/Kg/dia), o mesmo apresentou fígado com discreta tumefação dos hepatócitos e metamorfose gordurosa leve (**Figura 3C e D**). Nos rins, foi observada uma pequena tumefação das células tubulares (**Figura 4C e D**) e a presença de glomérulos atroficos (**Figura 4C**). O baço, apesar de significativamente menor, apresentou folículos evidentes e circunscritos (**Figura 5B**). Os demais órgãos também apresentaram características normais (**Figuras 6B, 7B e 8B**).

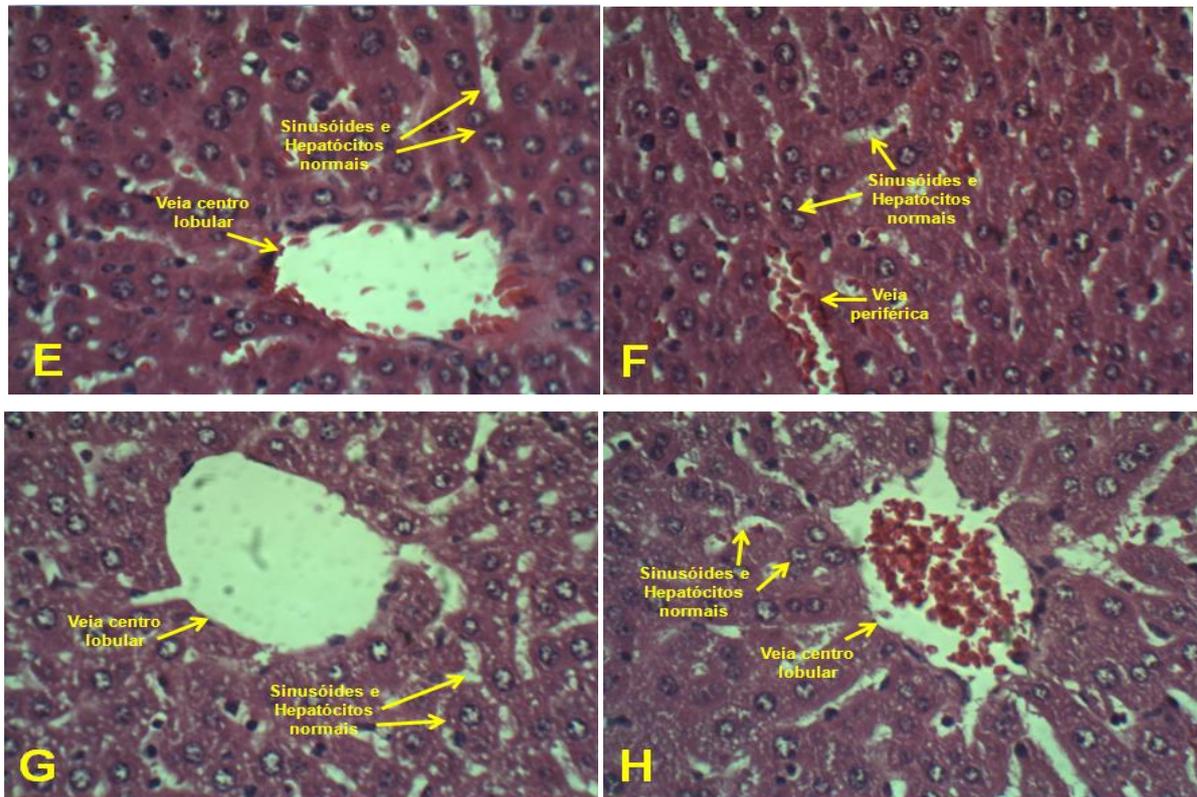
Como o principal órgão detoxificador e metabolizador do corpo, o fígado está sujeito a danos por uma enorme variedade de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais. Embora a maior parte da conversão metabólica das toxinas ocorra no fígado, células renais, células da mucosa intestinal e dos pulmões, e, até mesmo da pele, também podem estar envolvidas (LIEBLER; GUENGERICH, 2005). De qualquer modo, mesmo lesões hepáticas substanciais ocorridas na presença de xenobióticos (como o 5-FU) são potencialmente reversíveis, desde que, a arquitetura do tecido conjuntivo se mantenha íntegra e capaz de favorecer a regeneração hepatocelular, ao ponto que, mesmo após a morte de 50% dos hepatócitos por lesão

aguda, caso a matriz extracelular e seus componentes estejam intactos, ainda sim pode haver regeneração de lóbulos hepáticos inteiros (KUMAR et al., 2004).

No geral, a ausência de eosinofilia acentuada, núcleos picnóticos, neutrófilos e membranas celulares desintegradas confirmam a inobservância de áreas necróticas isquêmicas ou apoptóticas na presença de insulto tóxico (FDCM) ou imunológico de caráter irreversível em todos os órgãos corados por H/E e analisados por microscopia óptica, achados que comprovam a ausência ou a mínima toxicidade da FDCM por esse parâmetro, o que corrobora com os outros testes toxicológicos realizados.

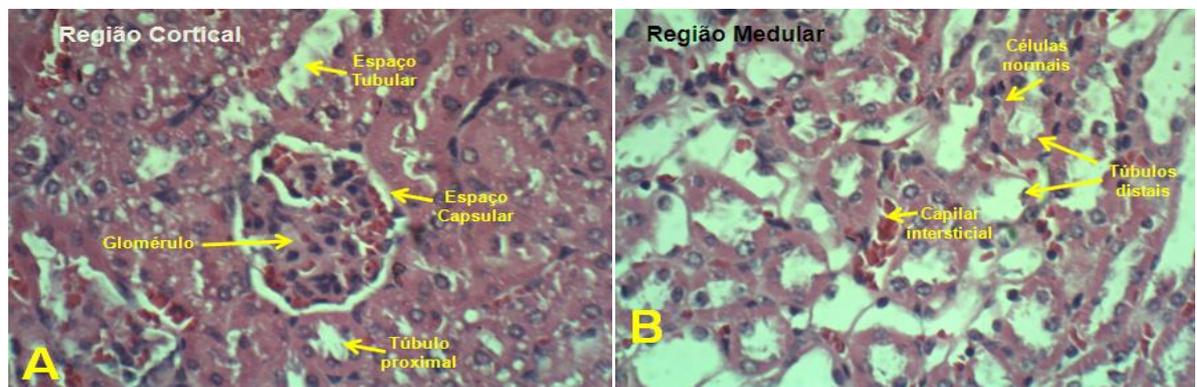
Figura 3 - Análise histológica do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (C e D). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (E e F) e 100 mg/kg/dia (G e H). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

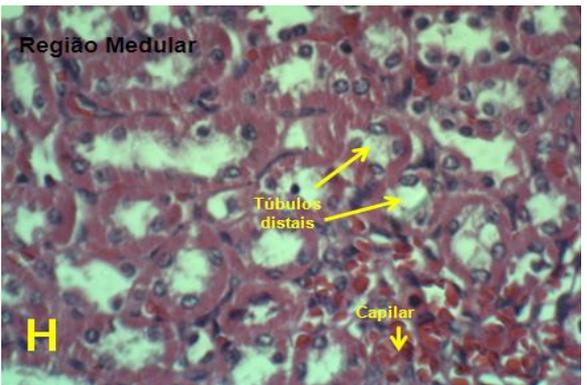
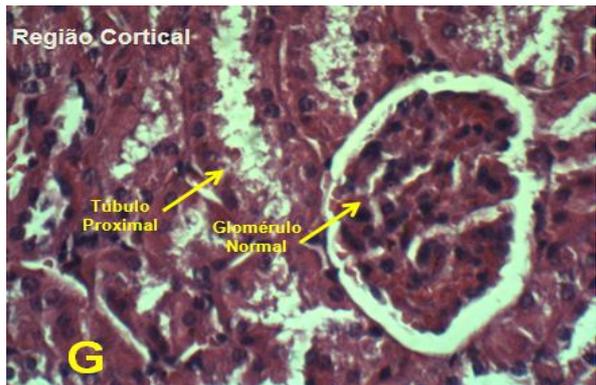
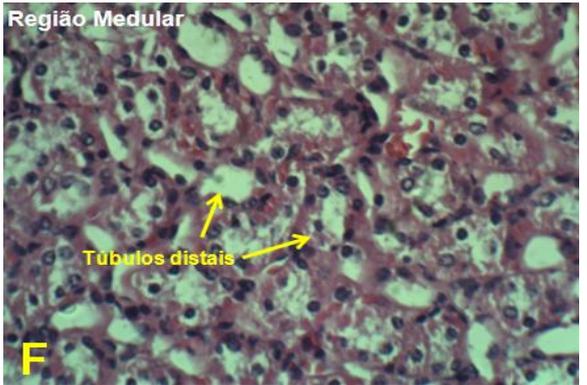
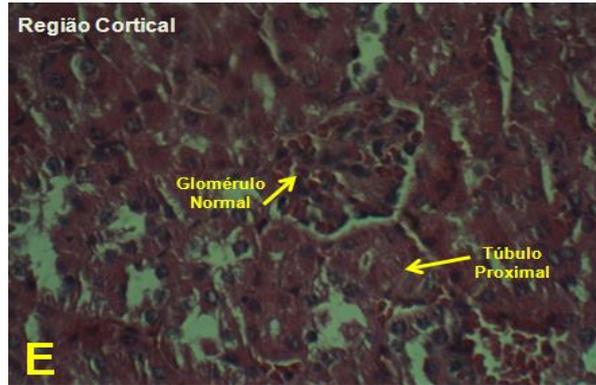
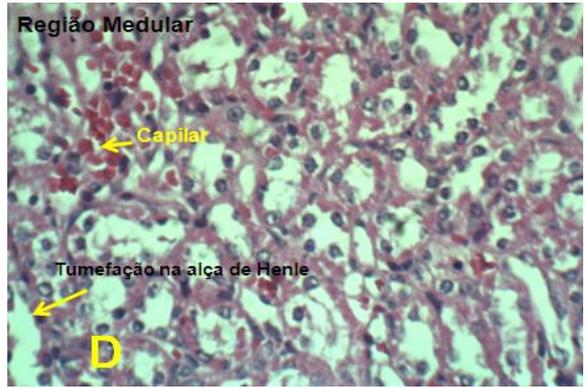
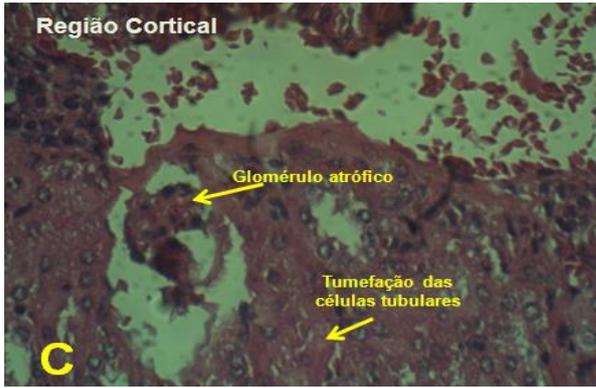




Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

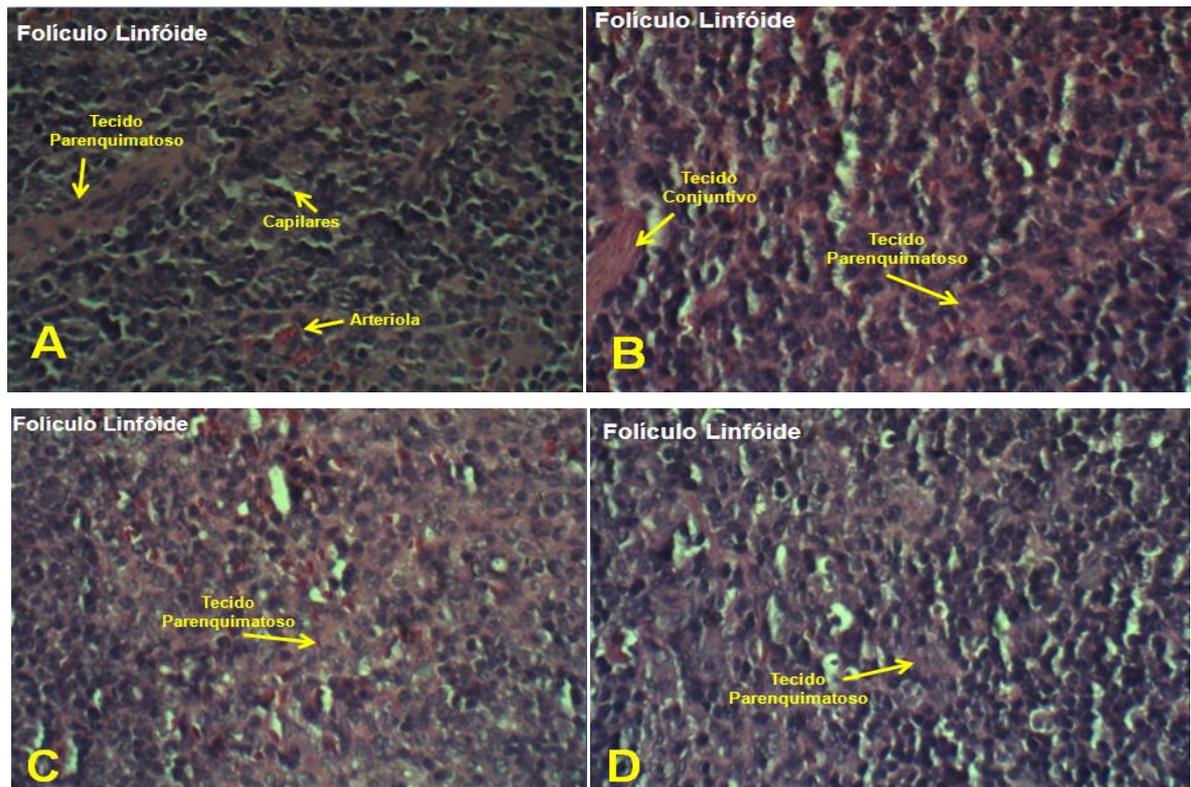
Figura 4 - Análise histológica dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantedos com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (C e D). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (E e F) e 100 mg/kg/dia (G e H). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x e 1000x.





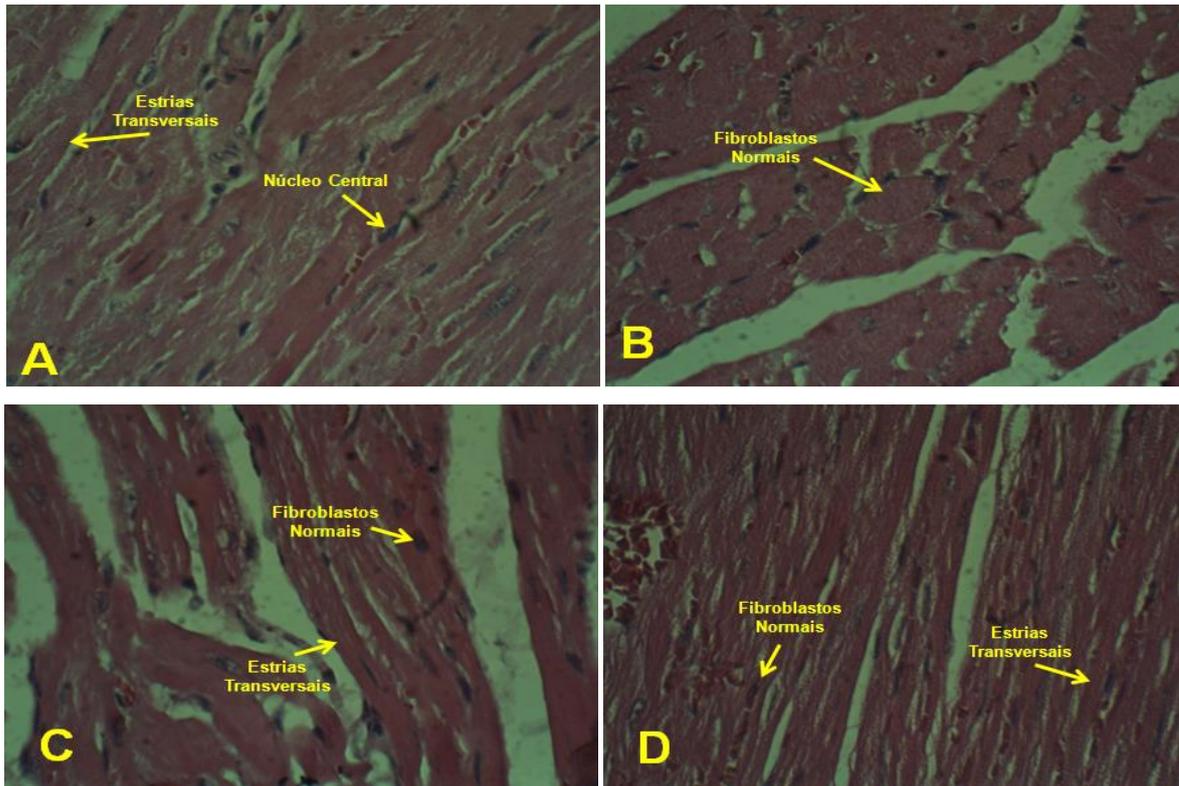
Fonte: Laborat3rio de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 5 - Análise histológica do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.



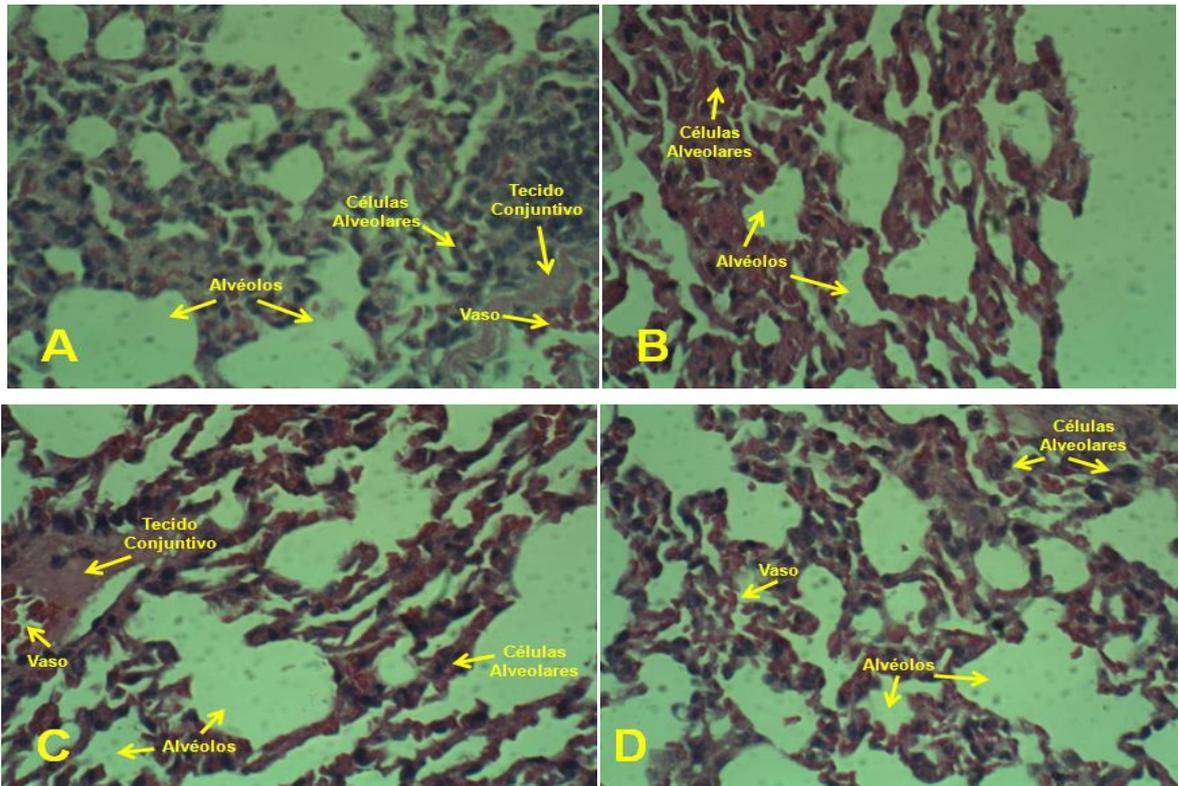
Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 6 - Análise histológica do coração de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.



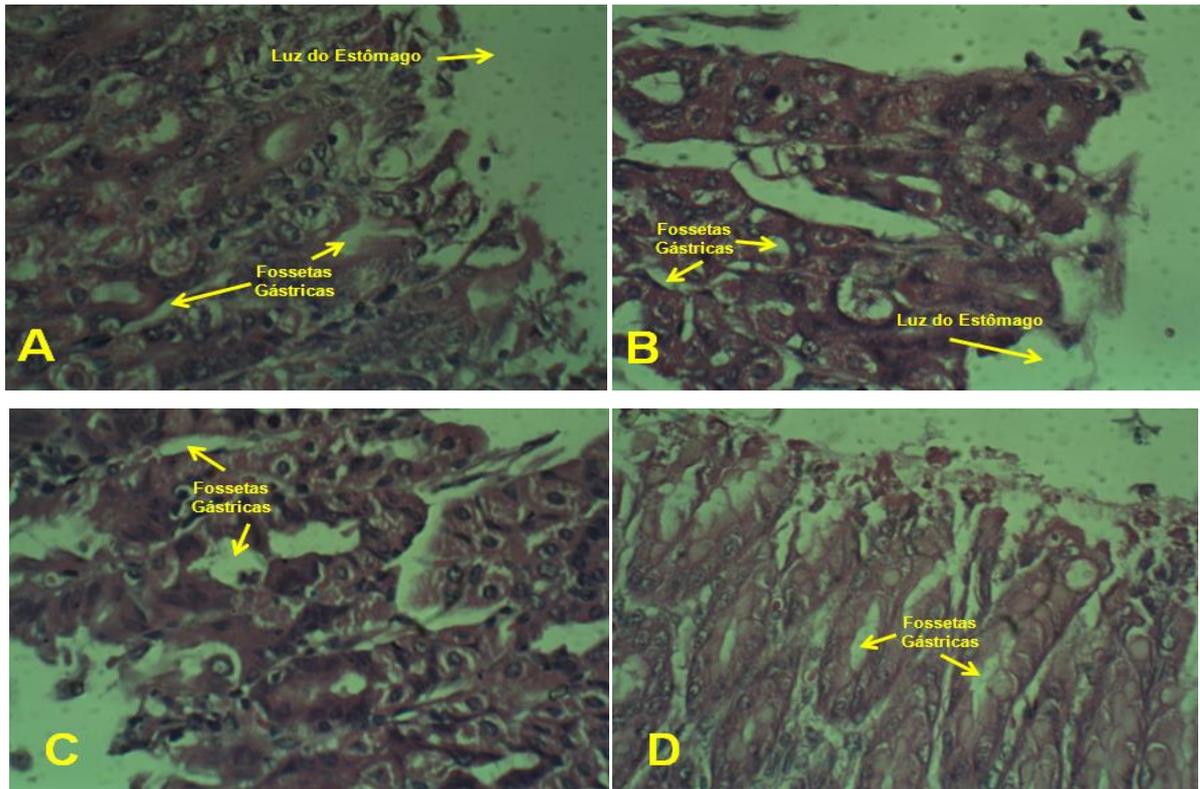
Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 7 - Análise histológica dos pulmões de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.



Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

Figura 8 - Análise histológica do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A FDCM foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg/dia (C) e 100 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.



Fonte: Laboratório de Cancerologia Experimental - Labcancer (2015).

3.6 Análise de Alterações Nucleares – Teste do Micronúcleo (MN)

Os estudos de genotoxicidade têm tido grande ênfase, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, a ocorrência de efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, não pode ser excluída. Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDITIMANN, 2003). Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo, quebras na molécula de DNA. Quando a lesão é fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é

denominado mutagênico (REKHA; NAIK; PRASAD, 2006; ABHILASH; SINGH, 2009).

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a substâncias mutagênicas, sendo que, muitas delas, podem ter origem natural, como, por exemplo, os fitoterápicos. Considerando que muitos extratos e princípios ativos, já descritos de plantas, têm sido utilizados como agentes terapêuticos, há um interesse considerável em determinar os riscos que estes podem causar à saúde, levando ao aparecimento de doenças, ou mesmo morte, em animais e em seres humanos. Assim, a avaliação do potencial citotóxico e mutagênico é necessária para assegurar o uso relativamente seguro de plantas medicinais pelo homem (SURH; FERGUSON, 2003).

Estudos científicos e tecnológicos avançados têm comparado a notável história de mutação, quebras cromossômicas e as consequências biológicas destes eventos, com a identificação de perigos e estimativa de risco de câncer. Impulsionada por preocupações regulatórias, a principal razão para a realização *in vitro* e *in vivo* de análises de genotoxicidade tem sido tentar prever se as moléculas são susceptíveis de serem agentes cancerígenos (MAHADEVAN et al., 2011).

Embora a toxicidade genética não seja uma medida de carcinogenicidade, ela é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade avaliam um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (TICE et al., 2000), havendo associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade tanto em roedores, como no homem (SARTO et al., 1987; COLDITZ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2009).

A avaliação da indução de MN é o principal teste *in vivo* em uma bateria de testes genotóxicos e é recomendado por agências fiscalizadoras em todo o mundo, como parte da avaliação de segurança dos produtos químicos e naturais. O ensaio, quando realizado corretamente, detecta efeitos clastogênicos e aneugênicos, quando há perda de partes ou do cromossomo todo, respectivamente (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo. Os MN, então, são estruturalmente pequenos núcleos representando o

material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (PERES; CURI, 2005).

A formação de MN é uma das maneiras que o organismo dispõe para se adaptar ao dano gerado por agentes exógenos ou endógenos e manter a célula viável (FENECH, 2007), por isso, a contagem de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células), associada a outros testes de genotoxicidade, tem sido um instrumento útil no monitoramento de indivíduos expostos a agentes genotóxicos (SARTO et al., 1987).

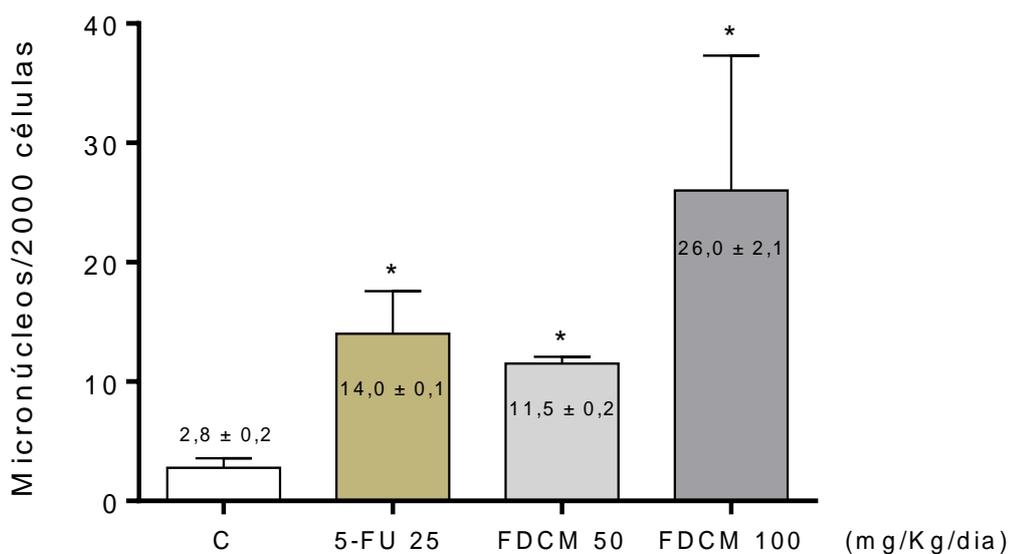
MN em eritrócitos jovens surgem, principalmente, a partir de fragmentos acêntricos ou cromossomos que são incapazes de migrar seguindo o fuso mitótico durante a divisão celular do tecido hematopoiético (SALAMONE; HEDDLE, 1983; OUANES et al., 2003). Um aumento na frequência de MN, em testes com animais tratados com diferentes substâncias, é uma indicação de dano cromossômico induzido (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Uma vez que a maioria dos compostos vegetais com atividade farmacológica é relativamente pouco estudada, em relação ao potencial mutagênico (MAISTRO et al., 2004), e a planta *M. caesalpinifolia* é cada vez mais usada popularmente, considerou-se importante avaliar o potencial genotóxico da FDCM através do ensaio de micronúcleo, a qual, apresentou genotoxicidade / mutagenicidade, nas concentrações testadas (50 e 100 mg/Kg/dia), por induzir a formação de MN em EPC ($11,5 \pm 0,2$ e $26,0 \pm 2,1$, para a menor e maior dose, respectivamente) em relação ao controle negativo ($2,8 \pm 0,2$). O quimioterápico 5-FU, utilizado como controle positivo, também apresentou aumento significativo no número de MN ($14,0 \pm 0,1$), também comparado com controle negativo ($2,8 \pm 0,2$) (**Figura 9**).

O estudo toxicogenético demonstrou ação genotóxica e clastogênica da FDCM, uma vez que as quebras de fita dupla representam umas das mais severas lesões ao DNA, devido à perda da continuidade cromossômica e à geração de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômero) que comprometem a segregação cromossômica durante a mitose (KAYE et al., 2004). Esse fato está relacionado à formação de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) na medula óssea dos camundongos dos grupos tratados com a FDCM (50 e 100 mg/kg/dia, via i.p.) (**Figura 9**). Entretanto, esses danos não podem ser extrapolados

a todas as células somáticas e germinativas do ser humano, pois não está claro se injúrias encontradas em células da linhagem sanguínea refletem, fielmente, aquelas ocorridas em órgãos-alvo (ALBERTINI et al., 2000; ANAZETTI et al., 2003; MATTIOLI et al., 2006). Logo, o dano ao DNA é somente a primeira etapa do processo carcinogênico (MATTIOLI et al., 2006), não fornecendo nenhuma informação sobre a potência da FDCM como carcinógeno.

Figura 9 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células) observado na medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas adultas, após tratamento intraperitoneal (50 e 100 mg/kg/dia), durante 7 dias consecutivos, com a fração diclorometano da casca do caule de *M. caesalpinifolia*. O controle negativo (C) recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%) e o controle positivo (5-FU) recebeu 5-fluorouracil 25 mg/Kg/dia. * $p < 0,05$ comparado com o controle (DMSO 5%) e analisado por ANOVA, seguido por Tukey.



Fonte: Autoria própria (2015).

Agentes antineoplásicos, usados atualmente na clínica, são indutores de quebras nas fitas do DNA de células de mamíferos, como visto com os inibidores de topoisomerase I (camptotecina) e topoisomerase II (etoposídeo) (SORTIBRÁN; TÉLLEZ; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, 2006) e com o 5-FU. Este último, por exemplo, é um antimetabólito muito usado para tratar adenocarcinoma de mama e cânceres do trato gastrointestinal, de cabeça e pescoço, graças a sua ação inibidora sobre a enzima timidilato sintase, entre outros mecanismos, apesar de sua atividade clastogênica *in vivo* (GREM, 1997; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2003; NOORDHUIS

et al., 2004). Os diterpenos ácido caurenóico (CAVALCANTI et al., 2006) e paclitaxel (BRANHAM et al., 2004) também apresentam positividade para testes genotóxicos (Cometa e Micronúcleo) realizados com células sanguíneas da série branca de humanos. Assim, é bastante provável que a indução de danos ao DNA observada com as duas concentrações da FDCM (50 e 100 mg/Kg/dia) seja um indício do mecanismo de ação da citotoxicidade tumoral, porém, cuidados devem ser tomados quanto ao uso da planta com fins terapêuticos, sendo necessários novos testes neste aspecto.

4 CONCLUSÃO

A pesquisa do perfil toxicológico da fração diclorometano da casca do caule de *Mimosa caesalpinifolia* demonstrou menor citotoxicidade em células normais mononucleares do sangue periférico humano quando comparada às células leucêmicas e causou pequenas alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais tratados. Estudos histológicos complementaram esses achados, uma vez que não foram observadas alterações em órgãos-chave, embora a genotoxicidade observada por meio da formação de micronúcleos sugira cuidados quanto ao uso da planta com fins terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Pesticide use and application: an indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, n.1-3, p.1-12, 2009.
- ADENEYE A. A.; ADEYEMI, O. O.; AGBAJE, E. O.; BANJO, A. A. Evaluation of the toxicity and reversibility profile of the aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (k. Schum.) Hallier f. in rodents. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines**, v.7, n.4, p.350-369, 2010.
- AFOLAYAN, A. J.; YAKUBU, M. T. Effect of *Bulbine natalensis* baker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n.4, p.814-820, 2009.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v.463, n.2, p.111-172, 2000.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, n.2-3, p.261-274, 2003.

AKDOGAN, M.; KILINÇ, I.; ONCU, M.; KARAOZ, E.; DELIBAS, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v.22, p.213-219, 2003.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The effect of phytohaemagglutinin on the growth, body composition, and plasma insulin of the rat at different dietary concentrations. **British Journal of Nutrition**, v.76, n.4, p.613-626, 1996.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BASS, A. S.; CARTWRIGHT, M. E.; MAHON, C.; MORRISON, R.; SNYDER, R.; MCNAMARA, P.; BRADLEY, P.; ZHOU, Y. Y.; HUNTER, J. Exploratory drug safety: A discovery strategy to reduce attrition in development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.60, p.69-78, 2009.

BENIGNI, R. Structure-activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens: mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, v.105, n.5, p.1767-1800, 2005.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v.8, p.156-163, 2008.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v.60, n.1, p.1-17, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de fitoterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-2369, 2010.

BRANHAM, M. T.; NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. **Mutation Research**, v.560, n.1, p.11-17, 2004.

BRUMMITT, R. F.; POWELL, C. E. **Authors of plant names**. Londres: Royal Botanic Gardens-Kew, 1992. 732p.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.3, p.388-392, 2006.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants**. 2 ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.854-863, 2008.

COLDITZ, G. A.; DEJONG, D.; HUNTER, D. J.; TRICHOPOULOS, D.; WILLETT, W. C. Harvard report on cancer prevention. Volume 1. Causes of human cancer. **Cancer Causes Control**, v.7, n.1, p.1-59, 1996.

CULLEN, J. M.; MILLER, R. T. The role of pathology in the identification of drug-induced hepatic toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.2, p.241-247, 2006.

FERREIRA, P. M. P. **Estudos pré-clínicos da atividade antiproliferativa e toxicológica da fração e de diterpenos clerodânicos isolados das folhas da planta *Casearia sylvestris* Swartz**. Fortaleza, 2010, p. 157. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M.; QUEIROZ, M. G.; MARTINS, A. M.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, p.207-216, 2009.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.1, p.313-330, 2015.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Betulin acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. **Medical and Pediatric Oncology**, v.35, n.6, p.616–618, 2000.

FULDA, S.; FRIESEN, C.; LOS, M.; SCAFFIDI, C.; MIER, W.; BENEDICT, M.; NUÑEZ, G.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.; DEBATIN, K. M. Betulin acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. **Cancer Research**, v.57, n.21, p.4956–4964, 1997.

GENETIC RESOURCES CORE FACILITY (GRCF). **Services: Bioprocessing**. Disponível em: <http://grcf.jhmi.edu/biorepository-cell-center/bioprocessing/blood-processing/>. Acesso em: 17 jun. 2015.

GREM, J. L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Seminars in Radiation Oncology**, v.7, n.4, p.249-259, 1997.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vitro* test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, n.2, p.187-190, 1973.

KALLNER, A.; TRYDING, N. IFCC Guidelines to the evaluation of drug effects in clinical chemistry. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.49, p.1-29, 1989.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.2, p.161-165, 2005.

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**. USA: McGraw-Hill Medical, 2003. 1088p.

KAYE, J. A.; MELO, J. A.; CHEUNG, S. K.; VAZE, M. B.; HABER, J. E.; TOCZYSKI, D. P. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. **Current Biology**, v.14, n.23, p.2096-2106, 2004.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v.455, n.1-2, p.155-166, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. 7. ed. China: WB Saunders, 2004. 1552p.

LIEBLER, D. C.; GUENGERICH, F.P. Elucidating Mechanisms of Drug-induced Toxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.410-420, 2005.

LIN, T. J.; SU, C. C.; LAN, C. K.; JIANG, D. D.; TSAI, J. L.; TSAI, M. S. Acute poisonings with *Breynia officinalis* - an outbreak of hepatotoxicity. **Journal of Clinical Toxicology**, v.41, p.591-594, 2003.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MAHADEVAN, B.; SNYDER, R. D.; WATERS, M. D.; BENZ, R. D.; KEMPER, R. A.; TICE, R. R.; RICHARD, A. M. Genetic Toxicology in the 21st Century: Reflections and Future Directions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.52, n.5, p.339-354, 2011.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by cometa assay. **Toxicology**, v.18, n.3, p.337-342, 2004.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**, p.183-205, 2003.

MATTIOLI, F.; MARTELLI, A.; GOSMARA, M.; GARBERO, C.; MANFREDI, V.; VARALDO, E.; TORRE, G. C.; BRAMBILLA, G. DNA fragmentation and DNA repair synthesis induced in rat and human thyroid cells by chemicals carcinogenic to the rat thyroid. **Mutation Research**, v.609, n.2, p.146-153, 2006.

MONÇÃO, N. B. N. **Contribuição ao estudo químico e biológico das cascas do caule de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.** Teresina, 2015, p. 162. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí - UFPI.

MONÇÃO, N. B. N.; COSTA, L. M.; ARCANJO, D. D.; ARAÚJO, B. Q.; LUSTOSA, M. C.; RODRIGUES, K. A.; CARVALHO, F. A.; COSTA, A. P.; CITÓ, A. M. G. L. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpinifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, n.3, p.456-462, 2014.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v.15, n.7, p.1025-1032, 2004.

OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, A. G.; SANTOS, R. A.; CSIPAK, A. R.; OLIVATO, C.; SILVA, I. C.; FREITAS, M. B.; BASSI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.; SOARES, C. P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v.24, n.6, p.501-506, 2009.

OUANES, Z.; ABID, S.; AYED, I.; ANANE, R.; MOBIO, T.; CREPPY, E. E.; BACHA, H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. **Mutation Research**, v.538, n.1-2, p.63-70, 2003.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PING, K. Y.; DARAH, I.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirta* in MCF-7 cell line model using comet assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.9, p.692-696, 2013.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v.1, n.1, p.1046-1051, 1995.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1551-1557, 2007.

REKHA; NAIK, S.N.; PRASAD, R. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. **Journal of Chemical Health and Safety**, v.13, n.6, p.12-19, 2006.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; DE OLIVEIRA, V. R.; DRUMOND, M. A. Sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*): árvore de múltiplo uso no Brasil. **Embrapa: Comunicado Técnico**, n.104, p.1-4, 2003.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, n.4, p.288-291, 1991.

SACHER, R. A., McPHERSON, R. A. **Widmann's clinical interpretation of laboratory tests**. Washington: Davis Company, 2000. 1090p.

SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol. **Chemical Mutagens**, v.8, n.1, p.111-149, 1983.

SANTOS, P. M. L.; JAPP, A. S.; LIMA, L. G.; SCHRIPSEMA, J.; MENEZES, F. S.; KUSTER, R. M. A atividade antioxidante dos extratos de folhas de *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.147-153, 2010.

SANTOS FILHO, P. R.; FERREIRA, L. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.6, p.1000-1005, 2011.

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. The Micronucleus Assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v.2, n.1, p.11-17, 1987.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v.31, n.1, p.9-15, 1975.

SHAHJAHAN, M.; SABITHA, K. E.; JAINU, M.; SHYAMALA, D. C. S. Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p.194-198, 2004.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. Teresina, 2015, p. 166. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí – UFPI.

SORTIBRÁN, A. N. C.; TÉLLEZ, M. G. O.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.604, n.1-2, p.83-90, 2006.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v.3, n.1, p.25-41, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2005. 640p.

SURH, Y. FERGUSON, L. R. Dietary and medicinalant imutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential - highlightsof a symposium. **Mutation Research**, v.523-524, n.1, p.1-8, 2003.

TICE, R. R.; AGUERRÍ, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, H.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v.40, n.12, p.1635–1660, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, v.45, n.1, p.1-8, 1985.

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.6, p.1303-1314, 2004.

WHO, W. H. O. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines: global situation issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WICK, W.; GRIMMEL, C.; WAGENKNECHT, B.; DICHGANS, J.; WELLER, M. Betulin acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. **Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v.289, n.3, p.1306–1312, 1999.

WILLIAMS, D. P.; KITTERINGHAM, N. R.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; SMITH, D. A.; PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Current Drug Metabolism**, v.3, n.4, p.351-366, 2002.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v.175, n.1, p. 17-25, 2002.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M.; TORRES-BUGARÍN, O.; ZAMORA-PEREZ, A. L.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; RAMOS-IBARRA, M. L.; GALLEGOS-ARREOLA, P.; FLORES-GARCÍA, A.; LÓPEZ-URIBE, A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-fluorouracil. **Archives of Medical Research**, v.34, n.2, p.141-144, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Certificados

1. Projeto “**Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* Benth**” apresentado no III Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado “**Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da espécie vegetal *Mimosa Caesalpinifolia* Benth**” de autoria de Renata Rosado Drumond, e Jurandy do Nascimento Silva, Nayana Bruna Nery Monção, Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Paulo Michel Pinheiro Ferreira foi apresentado, na modalidade painel, durante o III Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, realizado nos dias 6 e 7 de novembro de 2014 com carga horária de 20 horas aula.

Teresina-PI, 07 de novembro de 2014

Paulo Michel P. Ferreira

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Coordenador Geral

Rivelilson Mendes de Freitas

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas
Coordenador Científico
Curso de Farmácia
CPF: 775.580.745.372
Universidade Federal do Piauí-UFPI

2. Premiação com Menção Honrosa pela apresentação do Projeto “**Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da espécie vegetal *Mimosa caesalpinifolia* Benth**” no III Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado “**Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da espécie vegetal *Mimosa Caesalpinifolia* Benth**” de autoria de Renata Rosado Drumond, e Jurandy do Nascimento Silva, Nayana Bruna Nery Monção, Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Paulo Michel Pinheiro Ferreira foi premiado com **Menção Honrosa** pela apresentação em forma de painel durante o III Workshop de Projetos e Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Teresina-PI, 6 de novembro de 2014

Paulo Michel P. Ferreira

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Coordenador Geral

Rivelilson Mendes de Freitas

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas
Coordenador Científico
Curso de Farmácia
CPF: 775.580.745.372
Universidade Federal do Piauí-UFPI

3. Trabalho "Ação antitumoral de uma fração do caule de *Mimosa caesalpinifolia* Benth" apresentado no II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica.



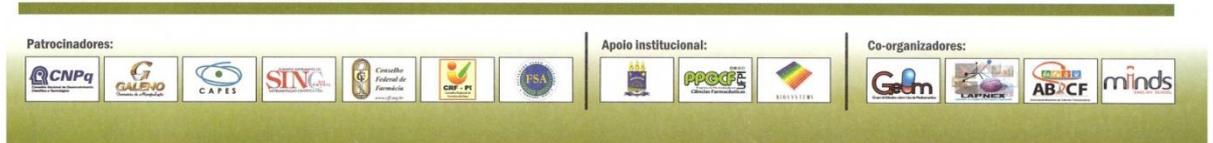
Certificamos que DRUMOND, R.R., SOUSA, I.J.O., SOUSA, A.N., GOUDINHO, A.F., ALENCAR, M.V.O.B., MATA, A.M.F.O., MONÇÃO, N.B.N., CITÓ, A.M.G.L., FERREIRA, P.M.P. apresentaram o trabalho "AÇÃO ANTITUMORAL DE UMA FRAÇÃO DO CAULE DE *Mimosa caesalpinifolia* Benth" na sessão painel durante o II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 9 a 11 de abril de 2015, no Blue Tree Towers Rio Poty na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 11 de abril de 2015.

Rivellson Mendes de Freitas
Prof. Dr. Rivellson Mendes de Freitas
Coordenador Geral

Livio César Cunha Nunes
Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes
Sub-coordenador Geral

Hiliris Rocha e Silva
Profa. Dra. Hiliris Rocha e Silva
Coordenadora Comissão Científica



ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 18 de Julho de 2014.

Ilmo.

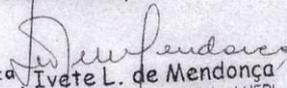
Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA
Departamento: Biofísica e Fisiologia- CCS/UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (18 de Julho de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **034/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Atividade citotóxica, antitumoral, tóxica e neurofarmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Agosto/2014 à Julho/2016, e serão usados 210 Camundongos isogênicos swiss (105 machos e 105 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.^a **Ivete L. de Mendonça**
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO C: Artigo “Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells” publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências, utilizando o Sarcoma 180 como modelo experimental.